

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA ELEKTROTECHNIKY A KOMUNIKAČNÍCH TECHNOLOGIÍ
ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION
DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

MĚŘENÍ KONTRAKTIBILITY A VIABILITY IZOLOVANÝCH SRDEČNÍCH
BUNĚK

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

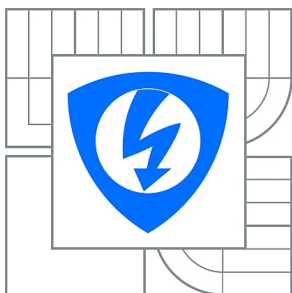
Ing. ONDŘEJ KAVÁLEK

BRNO 2011



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA ELEKTROTECHNIKY A KOMUNIKAČNÍCH
TECHNOLOGIÍ

ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION
DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

MĚŘENÍ KONTRAKTIBILITY A VIABILITY IZOLOVANÝCH SRDEČNÍCH BUNĚK

THE MEASUREMENT OF ISOLATED CARDIAC CELLS CONTRACTION AND THEIR VIABILITY

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Ing. ONDŘEJ KAVÁLEK

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. MILAN RYCHTÁŘIK

BRNO 2011



**VYSOKÉ UČENÍ
TECHNICKÉ V BRNĚ**

**Fakulta elektrotechniky
a komunikačních technologií**

Ústav biomedicínského inženýrství

Diplomová práce

magisterský navazující studijní obor
Biomedicínské a ekologické inženýrství

Student: Ing. Ondřej Kaválek

ID: 78576

Ročník: 2

Akademický rok: 2010/2011

NÁZEV TÉMATU:

Měření kontraktibility a viability izolovaných srdečních buněk

POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:

Prostudujte problematiku elektrofyzologie srdeční buňky. Navrhněte jednoduchý offline detektor pohybu srdečních buněk, který bude zobrazovat změnu plochy a celkové zkrácení izolované srdeční buňky při kontrakci. Detektor realizujte v prostředí Matlab či LabView. Na izolovaných srdečních buňkách realizujte experimenty založené na hodnocení kontraktibility buněk v závislosti na změně kultivačního prostředí a době uplynulé od izolace. Tato měření doplňte o hodnocení vitality buněk pomocí chemických indikátorů.

Vlastní diplomová práce musí obsahovat formulaci cíle, charakteristiku současného stavu, teoretická a odborná východiska problémů.

DOPORUČENÁ LITERATURA:

[1] London B, Krueger J. W.: Contraction in voltage-clamped, internally perfused single heart cells, J. Gen. Phys., 1986, vol. 88

[2] Xu W.H., et al.: Measurement of Contraction of Isolated Cardiomyocytes During Anoxia/Reoxygenation and the Antagonism of Salvia Miltiorrhiza, 2001

Termín zadání: 15.10.2010

Termín odevzdání: 20.5.2011

Vedoucí práce: Ing. Milan Rychtářík

prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.
Předseda oborové rady

UPOZORNĚNÍ:

Autor diplomové práce nesmí při vytváření diplomové práce porušit autorská práva třetích osob, zejména nesmí zasahovat nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a musí si být plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č.40/2009 Sb.

Abstrakt

Diplomová práce se zabývá měřením viability a kontraktibility srdečních buněk. Práce je rozdělena na dvě hlavní části – teoretickou a praktickou. V první teoretické části dochází k nastínění elektrofyzologie buňky a zpracování obrazu. V praktické části již dochází k detekci pohybu srdečních buněk za použití excentricity v programu Matlab. Pro zjištění viability byly zkoumány izolované kardiomyocyty v různých médiích, například v DMEM a MPRI.

Abstract

The master's thesis deals with research of viability and contraction measurement of cardiomyocytes. The work is divided into two main areas – theoretical and practical part. Theoretical part is aimed at electrophysiology of cardiomyocytes. Practical part includes detection of contractibility based on eccentricity in program Matlab. For research of viability, were used several media for example DMEM and MPRI.

Klíčová slova

Kardiomyocyty, viability, měření kontrakcí

Keywords

Cardiomyocytes, viability, contraction measurement

Bibliografická citace díla:

KAVÁLEK, O. Měření kontraktibility a viability izolovaných srdečních buněk. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, 2011. 47 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Milan Rychtářík.

Prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci na téma Měření kontraktibility a viability izolovaných srdečních buněk jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Jako autor uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že v souvislosti s vytvořením této diplomové práce jsem neporušil autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhl nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a jsem si plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení § 152 trestního zákona č. 140/1961 Sb.

V Brně dne 20. května 2011

.....
podpis autora

Poděkování

Děkuji vedoucímu diplomové práce Ing. Milanu Rychtárikovi za účinnou metodickou, pedagogickou a odbornou pomoc a další cenné rady při zpracování mé diplomové práce.

V Brně dne 20. května 2011

.....
podpis autora

Obsah

1	Úvod.....	7
2	Teoretická část.....	8
2.1	Elektrofyzologie srdeční buňky	8
2.2	Vznik a funkce bioelektrických signálů.....	10
2.3	Regenerace srdečních buněk.....	14
2.4	Současný stav dané problematiky	18
2.5	Využití izolovaných srdečních buněk.....	19
2.6	Zpracování obrazů.....	19
2.6.1	Analýza obrazu	19
2.6.2	Snímání a digitalizace.....	19
2.6.3	Předzpracování.....	20
2.6.4	Popis nalezených objektů	20
2.6.5	Porozumění obsahu.....	20
2.6.6	Předzpracování obrazu.....	21
2.6.7	Segmentace	21
2.6.8	Příznakový popis objektů	22
2.6.9	Klasifikace objektů	22
2.7	Excentricita	23
3	Praktická část.....	24
3.1	Izolace srdečních buněk	24
3.2	Příprava externího roztoku	24
3.3	Kontraktibilita izolovaných srdečních buněk	26
3.3.1	Detektor kontrakce srdečních buněk	28
3.3.1.1	Úprava obrazu	28
3.3.1.2	Excentricita	33

3.3.2	Výsledky kontraktibility	34
3.4	Viabilita buněk	35
3.4.1	Sčítání buněk v Bürkově komůrce	35
3.4.2	Kultivace buněk	38
3.4.3	Výsledky viability.....	39
4	Závěr	42
	Použitá literatura	43
	Přílohy	45

1 Úvod

Buněčné kultury dnes patří mezi základní techniky používané ve výzkumu i ve výrobě. Mají celou řadu použití. Ve výzkumu slouží především jako zdroj materiálu pro pokusy. Kultivované buňky jako pokusný model mají dnes již své pevné a nenahraditelné postavení. [1]

Využití buněčných kultur v experimentální práci má ve srovnání s jinými typy biologických modelů, např. v porovnání s použitím laboratorního zvířete nebo izolovaného orgánu či tkáně, zásadní výhody. Především, pokus probíhá na jediném, dobře charakterizovaném buněčném typu a jeho výsledky nejsou ovlivněny interakcí s jinými orgány, tkáněmi či buněčnými populacemi. Radu buněčných linií lze snadno kultivovat a v krátké době je možné získat poměrně velké množství přesně definovaného a homogenního materiálu, což při práci s jinými biologickými modely bývá obtížné. Na kultivovaných buňkách lze také bez nesnází provádět experimenty, při nichž dojde k jejich zničení. Naproti tomu zničení nebo poškození pokusného modelu při práci se zvířaty přináší etické problémy a v případě pokusu na lidech je zcela nemyslitelné. [1]

Na druhou stranu je potřeba počítat i s významnými omezeními, která použití buněčných kultur limitují. Kultivované buňky se uchovávají v umělém kultivačním médiu, jehož složení neodráží přesně složení vnitřního prostředí v organismu, a také v atmosféře s mnohonásobně vyšším tlakem kyslíku, než odpovídá situaci ve tkáních. Kultivované buňky postrádají obvyklý tkáňový kontext, tj. přítomnost jiných buněčných typů, s nimiž by *in vivo* komunikovaly a vyměňovaly si nejrůznější látky. V důsledku toho se často mění jejich vlastnosti, takže nemusejí přesně odpovídat vlastnostem stejných buněk v organismu. Při experimentech s kultivovanými buňkami musíme mít tedy na paměti, že pracujeme s modelem *in vitro*, který může a nemusí dobře odrážet poměry za podmínek *in vivo*. Práce s kultivovanými buňkami je pro výzkum velmi přínosná a rozšiřuje možnosti, které nám poskytují jiné pokusné modely, nemůže však beze zbytku nahradit pokusy prováděné na tkáních, orgánech a laboratorních zvířatech nebo lidských dobrovolnících. [1]

Následující práce se zabývá měřením viability a kontraktibility izolovaných srdečních buněk. V první teoretické části dochází k nastínění elektrofyzologie buňky a zpracování obrazu. V praktické části již dochází k detekci pohybu srdečních buněk

s využitím excentricity. Z důvodu nalezení změny pohybu byl vytvořen detektor v programu Matlab. Následuje oblast zabývající se zjištěním viability, ve které jsou použity různé druhy médií.

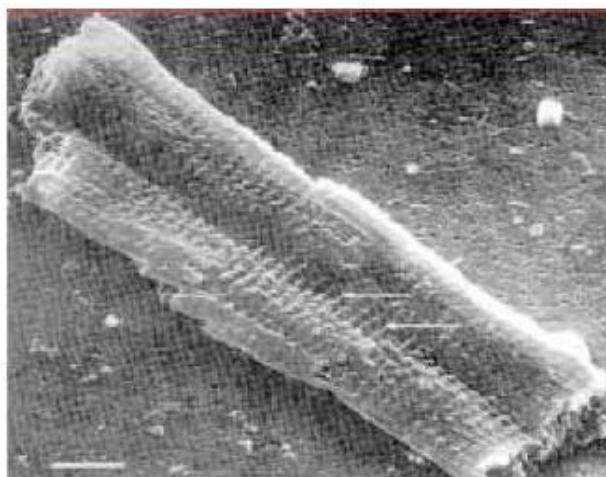
2 Teoretická část

2.1 Elektrofyziologie srdeční buňky

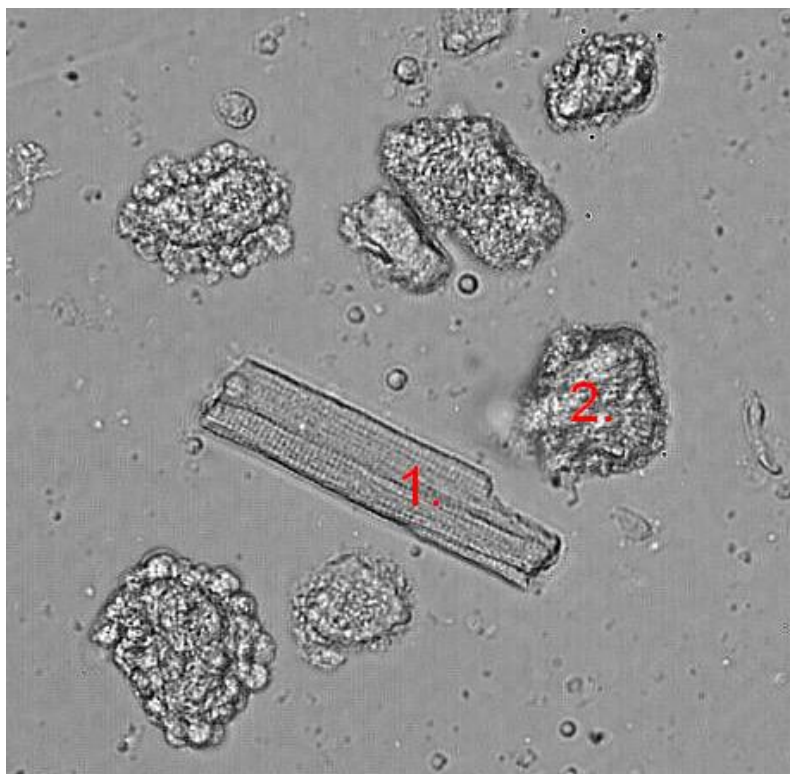
Pro pochopení elektrofyziologie bude následovat obecný popis začínající u srdce, který bude pokračovat do podrobnějšího mikroskopického náhledu. Srdce jako takové je zdrojem kinetické energie, což se projevuje pulzovým vypuzováním krve do cévního systému. Jedná se o oběh plicní (pravá komora) a oběh systémový (levá komora). Distribuční síť srdce se skládá z arteriálního řečiště, aorty (zdroj potenciální energie), arterie a arteriol (periferní rezistence, změna pulzového toku v plynulý do kapilár). Sběrná síť se skládá z venózního řečiště s velkou objemovou kapacitou a chlopňového aparátu, který slouží k podpoře venózního návratu. Vlákná srdeční tkáně se nazývají **myofibrily**, které se dělí na sarkomery. **Sarkomery** jsou úseky svalové buňky mezi dvěma Z-disky o délce 2-2,4 μm . Skládají se z tenkých vláken zakotvených v Z disku, mezi která patří **aktin**, **troponin**, **tropomyosin**. Tlustá vlákno, které má hlavu a krk, z čehož tvoří příčné můstky má **myosin**. Zdrojem vápníku (Ca^{++}), energie (ATP) je zde **cytosol**. Ke kontrakci srdečního svalu dochází mechanismem klouzavých vláken. V klidu je vztah mezi aktinem a myosinem blokován troponinem. Stimul ke kontrakci proběhne tak, že excitace způsobí uvolnění Ca z cytosolu do myofibril a jeho vazbu na troponin. Troponin s tropomyosinem deblokují aktin k vazbě na myosin. Příčné můstky myosinových molekul se připoutají na aktin a překlopí se. Zároveň dochází k přitahu středu sarkomery. Dochází ke kontrakci čili **sysotle**. V případě relaxace se Ca odsune z vazby na troponin zpět do cytosolu. Troponin zbaven Ca zablokuje vazbu mezi aktinem a myosinem. Příčné můstky se uvolní, aktinová vlákna se oddálí od středu sarkomery, ta se tím prodlouží a dojde k **diastole**. K přesunům Ca i cyklickým pohybům myozinových příčných můstků je třeba nepřetržité dodávky energie (ATP apod.). [2]

Tab. č. 1.: Rozdíl mezi srdečním a kosterním svalem [2]

Srdeční sval	Kosterní sval
<ul style="list-style-type: none"> - myokard - funkční syncitium - jeden impuls excituje všechny buňky 	<ul style="list-style-type: none"> - izolované buňky aktivované z vlastní motorické ploténky
<ul style="list-style-type: none"> - energie získávána výlučně oxidační fosforylací - množství mitochondrií - bohatá kapilární síť 	<ul style="list-style-type: none"> - oxidační fosforylace je hlavním zdrojem energie jen v tzv. pomalých svalových vláknech
<ul style="list-style-type: none"> - síla a rychlost kontrakce závisí na délce sarkoméry a na pohybu Ca^{++} v myocyty 	<ul style="list-style-type: none"> - síla kontrakce závisí na počtu aktivovaných svalových vláken
<ul style="list-style-type: none"> - akční potenciál je prolongovaný, repolarizace opožděna, refrakterní fáze 	<ul style="list-style-type: none"> - akční potenciál má velmi krátké trvání, možnost tetanizace



Obr. č. 1: Cardiomyocyt (EM) [18]



Popis obrázku:

1. živá srdeční buňka
2. mrtvá srdeční buňka

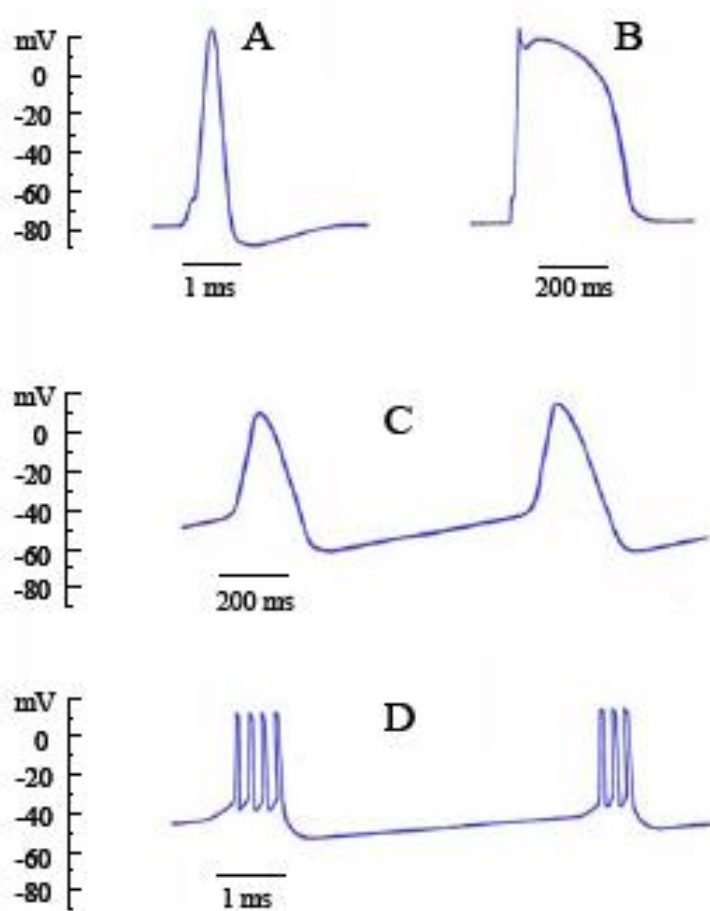
Obr. č. 2: Zobrazení živé a mrtvé buňky

2.2 Vznik a funkce bioelektrických signálů

Vnitřní prostředí živé buňky se ustaluje na jiném elektrickém potenciálu než okolní prostředí. Můžeme se o tom přesvědčit přímým měřením membránového napětí (U_m), definovaného jako rozdíl potenciálů měřených mezi mikroelektrodou zavedenou přes povrchovou membránu dovnitř buňky a elektrodou umístěnou v okolí buňky. Je-li buňka v klidu, hovoříme o **klidovém membránovém napětí** (U_{mk}), které se u živočišných buněk pohybuje v rozmezí -90 mV až -50 mV. Znaménko "minus" podle zavedené konvence značí, že vnitřní prostředí má záporný potenciál vzhledem k vnějšku buňky. Membránové napětí je ovlivnitelné vnějšími podněty. [4]

Vlastností tzv. **vzrušivých (excitabilních)** buněk je schopnost generovat elektrické impulzy, označované jako **akční napětí** (v dalším textu budeme někdy používat zkratky AN). Akční napětí vzniká za předpokladu, že membránové napětí při depolarizaci překročí určitou prahovou hodnotu (**prahové napětí** (U_{mp})). Uvádí se tím v činnost mechanismus kladné zpětné vazby, který způsobí, že depolarizace pokračuje spontánně. Zpravidla přitom membránové napětí změní na přechodnou dobu polaritu. Průběh AN prakticky nezávisí na velikosti nadprahového podnětu, který jej vyvolal. Podstatné rozdíly v průběhu AN však pozorujeme u různých druhů

vzrušivých buněk (nervových, svalových). Jeho trvání je uzpůsobeno funkci, kterou v jednotlivých případech plní. Viz. obr. č. 2. [4]

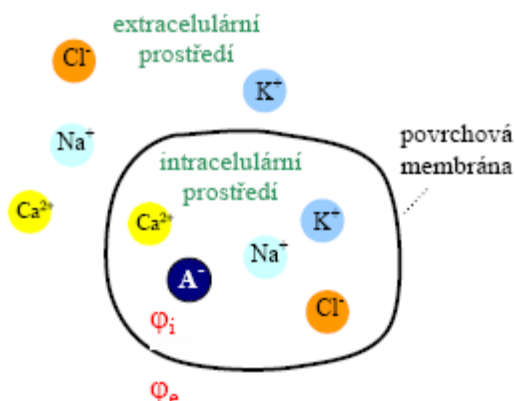


Obr. č. 2: Charakteristické průběhy akčního napětí. A - nervové vlákno; B - svalová buňka srdeční komory; C - buňka sinoatriálního uzlu; D - buňka hladkého svalu. V případě C a D se jedná o automatickou aktivitu. Všimněte si různých časových měřítek. [4]

Schopnost generovat impulzy akčního napětí je lokální vlastností membrán vzrušivých buněk. U **buněčných vláken** vznikne nejprve akční napětí v místě nadprahového podráždění. Odtud se pak šíří podél vlákna tím způsobem, že vybuzený úsek je vždy zdrojem nadprahového podráždění pro sousední, doposud nevybuzený úsek. Různá polarizace membrány v sousedních úsecích vyvolá lokální elektrické proudy, které depolarizují membrány nepodrážděného úseku až k prahové hodnotě membránového napětí. [4]

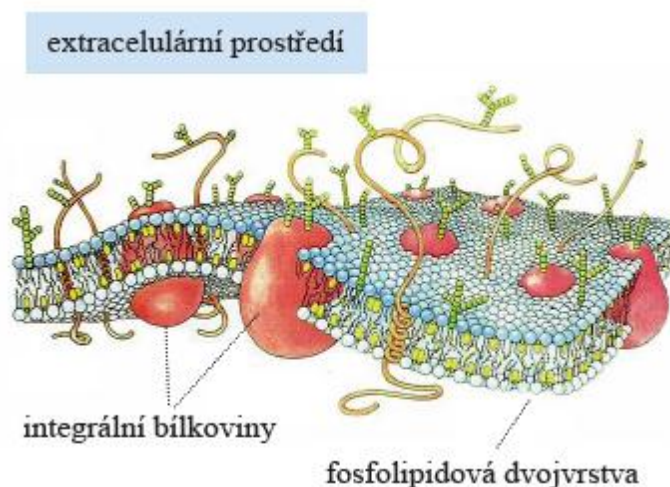
Jednoduchý model, v němž jsou vynechány všechny buněčné struktury, které není nutné z hlediska elektrických jevů uvažovat, zahrnuje pouze povrchovou membránu buňky a vodní roztoky ve vnějším (**extracelulárním**) a vnitřním (**intracelulárním**) prostředí viz. obr. č. 3. Hlavní anorganické ionty obsažené v obou

prostředích jsou **kationty** Na^+ , K^+ , Ca^{2+} a **aniont** Cl^- . Ve vnitřním prostředí se uplatní navíc organické anionty, které označíme A^- . Z hlediska vedení elektrického proudu se jedná o elektrolyty. Membránové napětí je rozdílem mezi elektrickými potenciály intracelulárního a extracelulárního prostředí ($U_m = \phi_i - \phi_e$). [4]



Obr. č. 3: Jednoduchý model pro výklad elektrických jevů na buněčné úrovni zahrnuje povrchovou membránu a elektrolyty vně a uvnitř buňky. [4]

Klíčem k pochopení vzniku klidového i akčního napětí je studium struktury a vlastností povrchové membrány viz. obr. č. 4. Jejím základem je elektricky nevodivá tenká dvojvrstva (~ 7.5 nm), tvořená molekulami fosfolipidů. Do této membrány jsou zabudovány makromolekuly bílkovin (proteinů), které plní různé funkce. Z hlediska elektrických jevů jsou zcela podstatné dva druhy, které podle jejich funkce budeme označovat jako **kanály** a **přenašeče**. V obou případech se jedná o transportní mechanismy, umožňující přenos iontů přes nevodivou fosfolipidovou membránu. [4]



Obr. č. 4: Model struktury biologické membrány [4]

V membránách buněk bylo odhaleno více přenašečových systémů. Jeden z nich, který je označován jako **sodíko-draslíková pumpa** (zkráceně **Na/K pumpa**) má však pro vytvoření podmínek vzniku membránového napětí zcela základní význam. Vytěšňuje Na-ionty z buňky výměnou za K-ionty a tím zajišťuje, že koncentrace obou zúčastněných iontů v intracelulárním a extracelulárním prostředí jsou rozdílné (budeme je značit $[Na^+]_i$, $[K^+]_e$ a odlišíme je indexy i, e), přičemž [4]

$$[Na^+]_e \gg [Na^+]_i, [K^+]_e \ll [K^+]_i. \quad (1)$$

Činnost Na/K pumpy můžeme volně přirovnat k současnému nabíjení dvou akumulátorových zdrojů. Skutečně, funkce Na/K pumpy vyžaduje stálý přísun energie, kterou molekulám přenašeče poskytují v intracelulárním prostředí přítomné molekuly **adenosintrifosfátu (ATP)**. Chemická energie se uvolňuje při hydrolýze ATP. Produkty reakce jsou molekula adenosindifosfátu (ADP) a fosfátová skupina. Koncentrační gradienty iontů Na^+ a K^+ vedou na druhé straně k vytvoření zdrojů elektrického napětí, které poskytují energii potřebnou pro generování a šíření impulzů akčního napětí u excitabilních buněk. Ve svých důsledcích vede činnost Na/K pumpy k vytvoření koncentračních rozdílů ostatních iontů splňujících nerovnosti. [4]

$$[Ca^{+}]_e \gg [Ca^{+}]_i, [Cl^{-}]_e \ll [Cl^{-}]_i. \quad (2)$$

Druhým mechanismem, který umožňuje výměnu iontů mezi vnitřním a vnějším prostředím buňky jsou membránové kanály. Jsou to rovněž bílkovinné molekuly, avšak na rozdíl od přenašečů, které mají pevná vazebná místa pro přenášené ionty, vytvářejí v membráně póry selektivně prostupné pro některé ionty. Otevírání a uzavírání těchto pórů (**vrátkování**) představuje náhodný proces závislý na intenzitě elektrického pole v membráně a tedy membránovém napětí. Vrátkování některých kanálů je ovládáno také jinými podněty (chemickou vazbou látek, mechanickým napětím aj.). Ionty mohou otevřeným kanálem procházet, aniž by docházelo k pevným vazbám. Přesto však průchod iontů celým kanálem nelze považovat za volnou difuzi. Protože většina kanálů je charakterizována menší či větší mírou selektivity vzhledem k propustnosti iontů, hovoříme o sodíkových, draslíkových, vápníkových nebo chlorových kanálech. [4]

2.3 Regenerace srdečních buněk

V případě poškození srdeční svaloviny, ke kterému dochází nejčastěji při infarktu, srdeční buňky odumírají a na jejich místě se pomnožují bledé **fibroblasty**, které zalátají postiženou oblast jizevnatou, poměrně tenkou kolagenovou tkání. **Kolagen** se nestahuje ani nemůže přenášet elektrické impulzy. Od poškození se oblast stává překážkou pro povely ke stahu. Hrozí arytmie a další oběhové potíže. [5]

Problém regenerace srdečních buněk spočívá v tom, že nemají **satelitní buňky**. Jejich vlastní schopnost pomnožovat se je omezena jen na časně fáze ontogenetického vývoje. Když se vyvíjejí kosterní svaly, jejich mnohojaderná, dlouhá svalová vlákna vznikají fúzí myoblastů. Myoblasty jsou krátké jednojaderné buňky s částečně vyvinutým kontraktilním systémem. Od r. 1961 je známo, že řada těchto malých myoblastů se s ostatními nespojí a zůstávají mimo tloustnoucí svalové vlákno. Jsou s ním však v těsném kontaktu pod společným vnějším obalem (bazální membránou). Tyto buňky se nazývají satelitní buňky. Podstatné je, že jejich jádra i těla si uchovávají jedinečnou schopnost dělení. Tuto schopnost ovšem nepoužívají, jsou-li v pořádku svalová vlákna, na nichž satelity jsou. [5]

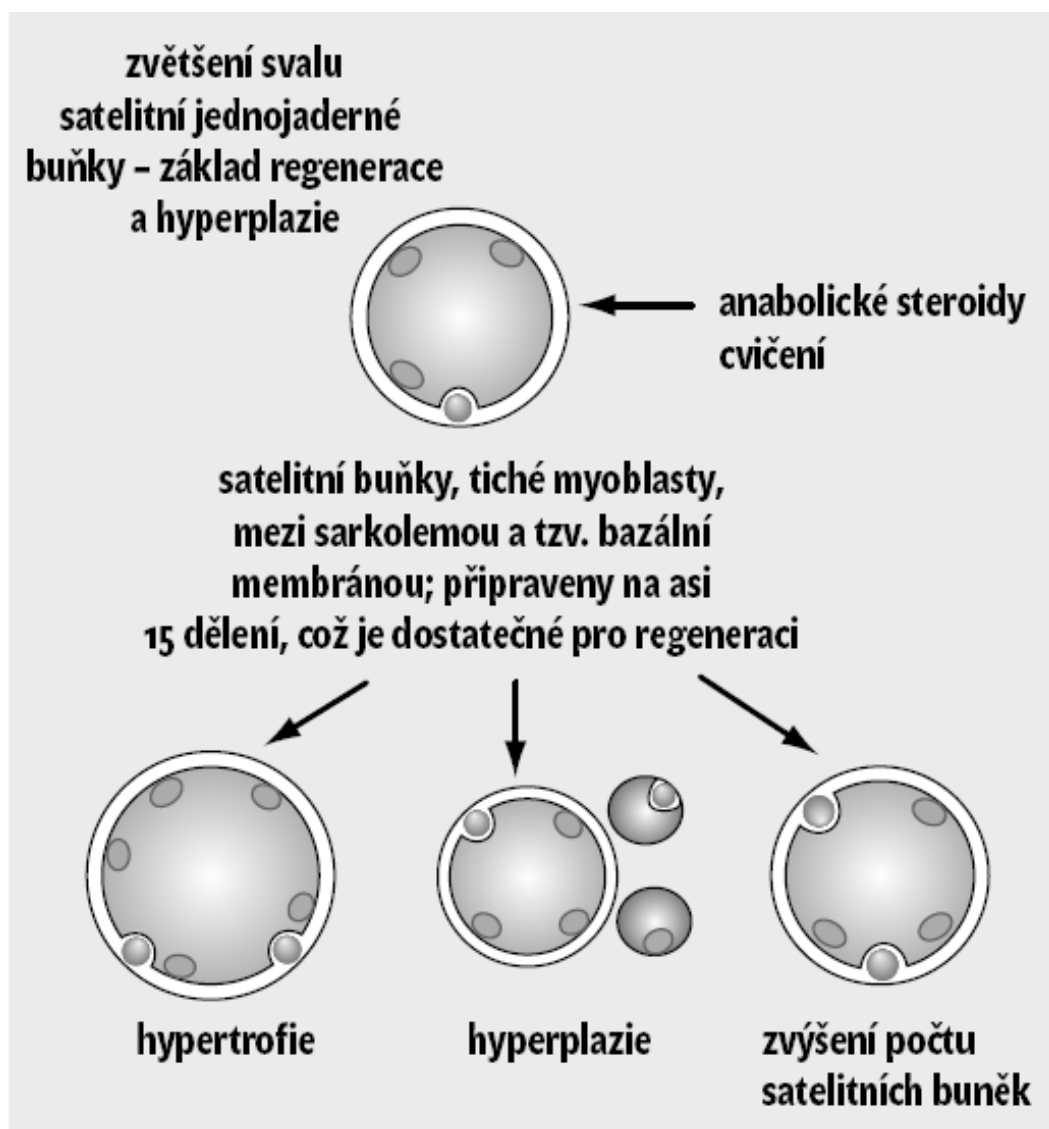
Při poškození, které může být způsobeno i neúměrnou námahou vlákna (stejně jako kardiocyty) nemohou sama opravit. Žádné z jejich vlastních jader, kterých jsou po fúzi myoblastů uvnitř stovky až tisíce, není už schopno dělení, protože se nacházejí v postmitotické fázi. V tomto okamžiku ale nastupují (myo)satelitní buňky. Téměř zároveň se zánikem poškozeného svalového vlákna se začínají dělit a splývají do nového svalového vlákna. Sval regeneruje. Je zajímavé, že se opět některé nespojí s ostatními a stanou se z nich satelity nového vlákna. Tak se regenerace svalu může opakovat i několikrát, je-li to nutné. [5]

Typ funkčně vybavených a k dělení připravených buněk jakéhokoli orgánu či tkáně říkáme buňky **progenitorové**. Na rozdíl od nediferencovaných a nesčíslněkrát se dělících buněk kmenových (např. krvetvorných buněk v kostní dřeni) se progenitorové buňky dělí omezeně. U svalu je to kolem patnácti dělení, což ovšem na průměrnou dobu našeho nynějšího života naprosto stačí. Progenitorové satelitní buňky jsou poměrně univerzální a při regeneraci vytvářejí zprvu jakýsi obecný prototyp svalového vlákna. Teprve pod vlivem nervů prorůstajících do místa regenerace se nová vlákna „specializují“ buď na skupiny vláken rychlých bílých (ta jsou

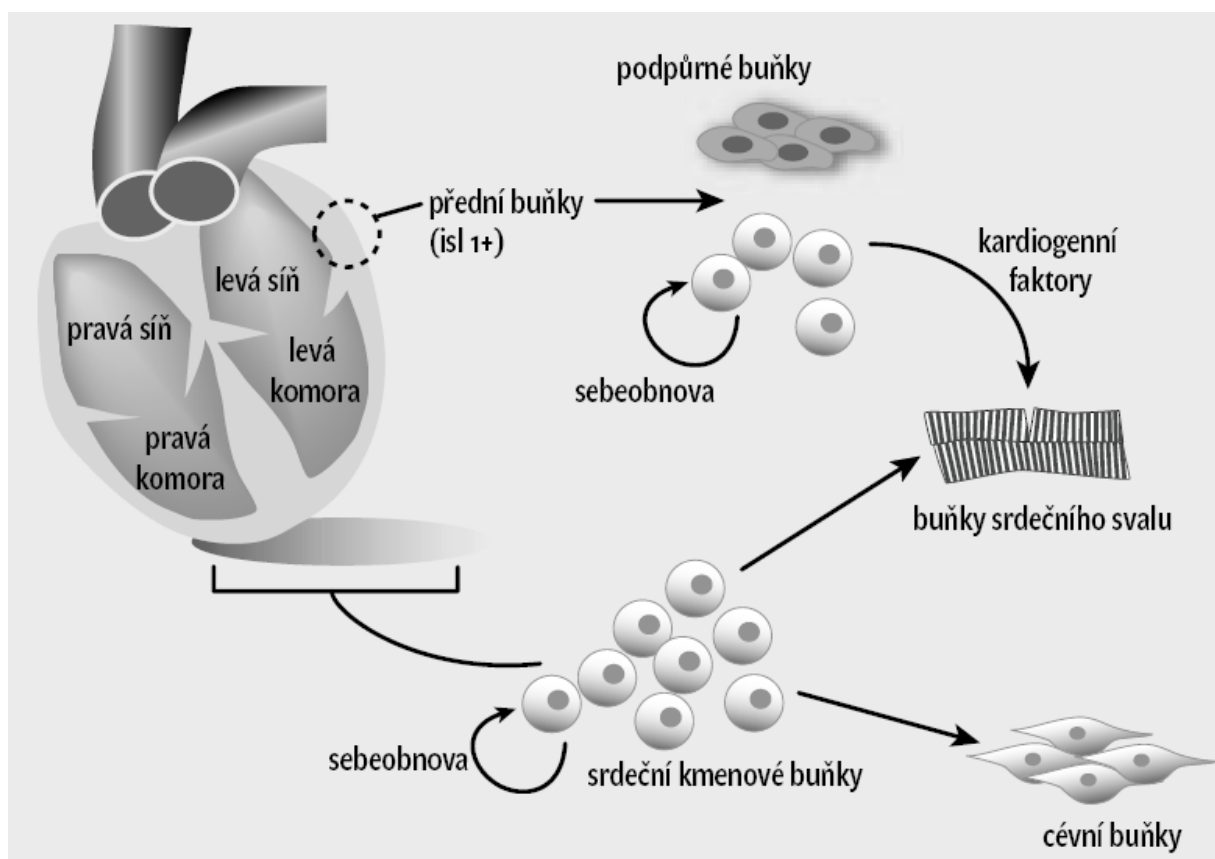
snadno unavitelná), nebo pomalejších červených (jsou plná myoglobinu a zajišťují vytrvalostní výkony a postoje těla). [5]

Satelitní buňky ale nejsou jen pasivními čekateli na zničení svaloviny. Jsou připraveny svižně reagovat i na zvýšené nároky při fyziologické zátěži, intenzivní či opakované svalové práci a přispívat k tréninkovým výsledkům silových sportovců. Při rostoucím průměru trénovaných svalových vláken (hypertrofii) je totiž nutno zvyšovat počet jader, aby se bioenergetika namáhaného vlákna udržovala na optimální úrovni. Vlastní jádra vláken se dělit nemohou, a proto jim při hypertrofii předávají svá jádra právě přilehlé myosatelitní buňky. [5]

Při jiném typu intenzivního tréninku se počet vláken zvyšuje, a to právě tímž procesem splývání satelitních buněk. V tomto případě narůstá svalová hmota zmnožením vláken – **hyperplazií**. [5]



Obr. č. 5: Schéma zvětšování svalové hmotnosti za pomoci satelitních buněk. [5]



Obr. č. 6: Pěstování izolovaných kartioblastů [5]

V dnešní době však již lze regeneraci kardiomyocitu řešit. K postupu ve výzkumu došlo díky stále se zlepšujícím detekčním metodám, které jsou využívány pro vypátrání i velmi malého počtu nějakého typu buněk. Máme-li dnes k dispozici nějaký znak, který je pro určité buňky charakteristický, můžeme ho oddělit od ostatních, které ho nemají. Výzkum tohoto jevu principu dokázal nalézt za použití srdcí laboratorních myší, potkanů a člověka nevelká množství buněk - kardioblastů, které nesou značky (markery) pro progenitorové linie. V srdci byly hledány buňky nesoucí jako identifikační znamení gen islet-1, který je typický pro vyvíjející se embryonální srdeční buňky. Po narození buněk s tímto identifikačním znakem rychle ubývalo. Přesto bylo možné zbylé z nich nejen detegovat fluorescenčními barvami a promyšlenou kolokalizací s jinými geny (např. použitím tamoxifen-citlivých receptorů pro estrogény), ale také je úspěšně bez poškození oddělit pomocí přístroje. [5]

Nezralé kardioblasty byly touto metodou nalezeny v podstatě ve všech funkčních částech srdce. V síních tvořily nevelké shluky, kdežto v komorách se vyskytovaly převážně jen jako ojedinělé buňky. Podle Christine L. Mummeryové bylo nalezeno např. u krysího srdce jen velmi malý počet (nějakých pět či šest set)

kardioblastů, které se zachovaly jako „relikt“ po nitroděložním vývoji srdce. Důležitější než počet kardioblastů je ale skutečnost, že jejich poměrný výskyt v jednotlivých částech srdce zůstává téměř stejný jak u laboratorních hlodavců, tak v srdci lidského novorozence, což umožňuje s jistou opatrností aplikovat poznatky z laboratoře na lidské poměry. [5]

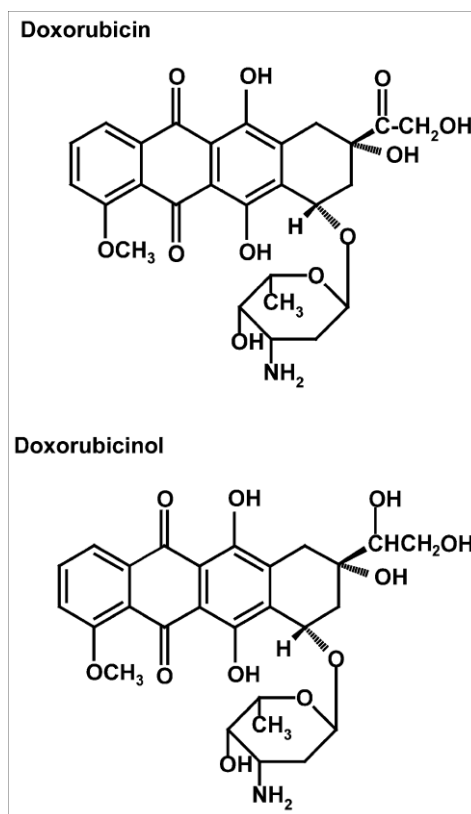
Nyní se budeme zabývat regenerační potencí, a také tím, zda-li si zbylé kardioblasty zachovají svou původní schopnost dělit se a nabývat vlastností funkčních srdečních buněk. Izolované kardioblasty byly pěstovány v tkáňových kulturách buď samostatně, nebo spolu s mezenchymálními podpůrnými srdečními buňkami, popřípadě s dospělými kardiocyty. Tím bylo napodobeno dvou důležitých fází vývoje skutečného srdce: fáze proliferace (množení) a fáze diferenciací (vyzrávání). Zpočátku se v přítomnosti mezenchymálních buněk kardioblasty jen dělily. Z několika set jich vznikly během necelého týdne miliony. Když dělení ustalo, začaly se v přítomnosti dospělých srdečních buněk diferencovat. Postupně vytvářely kontraktilní bílkoviny (např. aktinin a srdeční troponin T). V jejich membránách se objevily funkční vápníkové kanály, tak typické pro elektrickou aktivitu srdečních buněk. Také průběh jejich akčních potenciálů byl velmi podobný dozrálým kardiocytům. Buňky se začaly rytmicky stahovat, což je zase charakteristické pro spontánně bijící srdeční svalovinu. Bylo tedy prokázáno, celou baterií metod elektrofyzilogických, histochemických, fluorescenčních a kontrakčních (vždyť jich taky na to bylo deset), že kardioblasty skutečně dozrály na plnohodnotné kardiocyty. Ty se dokonce i navzájem propojily elektricky vodivými konexonovými kanálky (skulinovými spojeními, „gap junctions“), jak se sluší a patří na srdeční svalovinu hodnou toho jména. [5]

Co se týká praktického využití, věřme, že v budoucnu se podaří tyto nečetné, leč schopné progenitorové buňky z nemocného srdce izolovat. Po namnožení v tkáňových kulturách by je mohli kardiologové zpětně transplantovat do ohrožené či postižené oblasti srdečního svalu, podobně jako se to již v jistých případech provádí v mozku. Nebudou se tak léčit jen postinfarktové stavy, ale jistě i řada dalších kardiomyopatií, ať již vyvolaných infekcemi, vysokým krevním tlakem (hypertenzí) nebo jiným poškozením, např. volnými radikály. [5]

2.4 Současný stav dané problematiky

Ze současného výzkumu dané problematiky lze uvést pokusy, které provedli Ge-Xin Wang, Yong-Xiao Wang, Xiao-Bo Zhou a Michael Korth. Jednalo se o sledování účinků doxorubicinolu na excitaci-kontrakci u ventrikulárního myocytu morčete. [6]

Derivát doxorubicinu je široce používán k léčbě pacientů s nádorovým onemocněním. Kumulativní dávka související s kardiotoxicitou, je však stále významným klinickým problémem. Akutní projevy indukovaného doxorubicinu jsou kardiotoxické. Jedná se o elektrokardiografické abnormality, jako je prodloužení QT, QT apod. a později život ohrožující kardiomyopatie. [6]



Obr. č. 7: Chemické struktury doxorubicinu a oxorubicinolu [6]

Myocyt byl stimulován svorkou s proudem o frekvenci 0,5. Délka buňky byla sledována pomocí stabilního světla z důvodu jasné oblasti obrazu buněk, který byl plánovaný pro fotodiodu se 4-ms scanem. Změny v délce buňky během kontrakce byly kvantifikovány přes EDGE rozhraní. Signál byl poté předán do počítače pro on-line analýzu. Zaznamenané signály byly zkrácení špiček, čas mezi špičkami, a relaxační čas. [6]

2.5 Využití izolovaných srdečních buněk

Využití izolovaných kardiomyocytů v experimentech je v současné době převážně ve třech oblastech. U buněk živého a zdravého srdce se sleduje vliv chemikálií na jeho funkci. Další oblastí je nemocné ischemické srdce. Zde se sleduje, jak snížený kyslík degraduje mitochondrie, jak rychle probíhá v buňkách apoptóza a další experimenty. Model izolovaných myocytů má tu výhodu, že buňky lze přímo měřit, což u celého orgánu, nebo dokonce celého pacienta prakticky dnes nelze. Stejně tak nelze získat jiným způsobem (NMR, CT) přesnou molekulární kinetiku. V posledních dvou letech se rozvíjí výzkum založený na kultivaci s mesenchymálními kmenovými buňkami a určení přesné interakce. Jedná se o model, na kterém je měřeno, jak se mesenchymální buňka může uchytit v srdci a zdali se může například připojit elektricky vodivě na myocytu a fungovat jako vodič, či zdali dokonce pod vlivem okolních myocytů kompletně nepřemění na tepající myocyt. [7-9]

2.6 Zpracování obrazů

2.6.1 Analýza obrazu

Otázka detekce objektu a celkové zpracování počítačem je známá jako úloha počítačového vidění. Cílem technologie počítačového vidění je tvořit stroje, které dokáží provádět úlohy, jež umí zpracovávat lidé rychleji, přesněji, levněji, nebo ulehčit lidem od otrokové práce.[10]

2.6.2 Snímání a digitalizace

Při snímání se převádějí vstupní optické veličiny na elektrický signál spojitý v čase i úrovni. Vstupní informací může být jas (z TV kamery, scanneru), intenzita rentgenového záření, ultrazvuk, tepelné záření aj. Snímat se může v jednom nebo více spektrálních pásmech. Pro barevné snímání stačí tři spektrální složky - červená, zelená a modrá. [10]

Digitalizací se převádí vstupní spojitý signál odpovídající monochromatickému obrazu do diskrétního tvaru. Vstupní analogový signál je popsán funkcí $f(i,j)$ dvou proměnných - souřadnic v obraze. Funkční hodnota odpovídá např. jasu. Vstupní signál je vzorkován a kvantován. Výsledkem je matice přirozených čísel popisujících obraz. Jednomu prvku matice se říká obrazový element (picture element - pixel). Z hlediska zpracování obrazu jde o dále nedělitelnou jednotku. [10]

Existují i jiné možnosti reprezentace vstupního obrazu v počítači. Častým případem je popis obrazu koeficienty dvourozměrné Fourierovy transformace. Výhodou je to, že Fourierovu transformaci lze převést okamžitě optickými prostředky již před digitalizací. [10]

2.6.3 Předzpracování

Předzpracování znamená použití vhodných transformací pro potlačení nežádoucích informací, např. impulsního šumu, nebo naopak pro zvýraznění nějakých informací takovým způsobem, aby bylo možné obraz co nejlépe segmentovat a popsat. [10]

Asi nejtěžší krok postupu zpracování je segmentace, která dovolí v obraze najít objekty. Za objekty se považují ty části obrazu, které nás z hlediska dalšího zpracování zajímají. Při segmentaci se tedy často využívá znalosti interpretace obrazu (sémantika). [10]

2.6.4 Popis nalezených objektů

Lze je popsat buď kvantitativně pomocí souboru číselných charakteristik a (nebo) kvalitativně pomocí relací mezi objekty. Způsob popisu objektů je ovlivněn tím, na co se popis bude používat. Za krajně jednoduchý popis objektů lze považovat např. stanovení velikosti (plochy) objektů, tj. počet jemu odpovídajících obrazových bodů v obraze. [10]

2.6.5 Porozumění obsahu

Ve velmi jednoduchém případě můžeme za porozumění považovat klasifikaci objektů v obraze podle jejich velikosti. Jen o málo složitější je klasifikace objektů do několika předem známých tříd, např. na hranaté a kulaté. V obecném případě představuje porozumění interpretaci obrazových dat, o kterých se předem nic nepředpokládá. Porozumění obrazu je potom založeno na znalosti, cílech, tvorbě plánu k jejich dosažení a využití zpětných vazeb mezi různými úrovněmi zpracování. [10]

2.6.6 Předzpracování obrazu

Adaptivní mediánový filtr počítá hodnotu mediánu z k pixelů okolí $A_{k,w}$ zpracovávaného pixelu, přičemž w je zadaná délka strany čtvercového okolí a k je počet pixelů, které se nejméně liší svou hodnotou od zpracovávaného pixelu. [11]

Adaptivní mediánový filtr se nejčastěji používá k odstranění aditivního šumu, odstranění malých objektů a vyhlazení obrazu bez zkreslení tvaru - hranic a velikosti velkých objektů. [10, 11]

2.6.7 Segmentace

Segmentace obrazu je jedním z nejdůležitějších kroků vedoucích k analýze obsahu zpracovávaných obrazových dat. Snahou je rozčlenit obraz do částí, které mají úzkou souvislost s předměty či oblastmi reálného světa zachyceného na obraze. Výsledkem má být soubor vzájemně se nepřekrývajících oblastí, které buď jednoznačně korespondují s objekty vstupního obrazu, pak jde o kompletní segmentaci, nebo vytvořené segmenty nemusí přímo souhlasit s objekty obrazu a pak jde o částečnou segmentaci. Pro kompletní segmentaci je obecně nezbytná spolupráce s vyšší úrovní zpracování, v níž se využívá konkrétních znalostí řešeného problému. [10, 12]

Při částečné segmentaci je výsledkem rozdělení obrazu do samostatných částí, které jsou homogenní vzhledem k určitým zvoleným vlastnostem, jako jsou jas, barva, odrazivost, textura apod. Po zpracování složitého obrazu je výsledkem seznam oblastí, které jsou homogenní v jistých zvolených rysech. Oblasti se obecně mohou překrývat. Na data popisující částečnou segmentaci je nezbytné aplikovat další postupy, které pomocí vyšší úrovně umožní získat výslednou segmentaci obrazu. [10]

Jedním z hlavních problémů ovlivňujících segmentaci je nejednoznačnost obrazových dat, často doprovázená informačním šumem. Podle dominantní vlastnosti, kterou segmentace využívá, lze metody rozdělit do tří skupin. V první z nich metody využívají globální znalosti obrazu reprezentované obvykle histogramem určitých vlastností, segmentaci lze dále rozdělit na postupy vycházející z určování hranic mezi oblastmi obrazu a na postupy přímo vytvářející tyto oblasti. Není přitom podstatné, z jakých charakteristik při hledání hranic či při tvorbě oblastí vycházíme. Druhá a třetí skupina našeho třídění řeší duální problém, neboť každá oblast je jednoznačně reprezentována svou hranicí a každá uzavřená hranice

jednoznačně vypovídá o oblasti, kterou obemyká. V důsledku odlišného charakteru obrazových dat i odlišných algoritmů tvorby hranic a oblastí přinášejí obě skupiny metod poněkud rozdílné segmentační výsledky. Výsledky postupů obou skupin lze proto kombinovat a vytvořit jedinou popisnou strukturu. [10]

2.6.8 Příznakový popis objektů

Plocha objektu: Udává plochu objektu $M(0,0)$, nebo-li počet pixelů, ze kterých se objekt skládá, odpovídá momentu 0.řádu daného objektu. [10]

Plocha jednoho pixelu (pixel size): Tato hodnota se zadává v metrech. Vzhledem k tomu, že pro některé účely je tato jednotka příliš velká (např. mikroskopie) a pro jiné zase příliš malá (např. astronomie), lze velikost strany jednoho pixelu zadat v exponenciálním tvaru. Tady např. $2.55E-4$. Pokud velikost strany jednoho pixelu neznáme, zadáme hodnotu 1. Systém pak nebude pracovat v absolutních jednotkách, ale v pixelech. [10]

2.6.9 Klasifikace objektů

Proces klasifikace následuje po předzpracování, jehož účelem je takové vylepšení obrazu, aby klasifikátor měl pro svou činnost o klasifikovaných objektech maximum informací. [10]

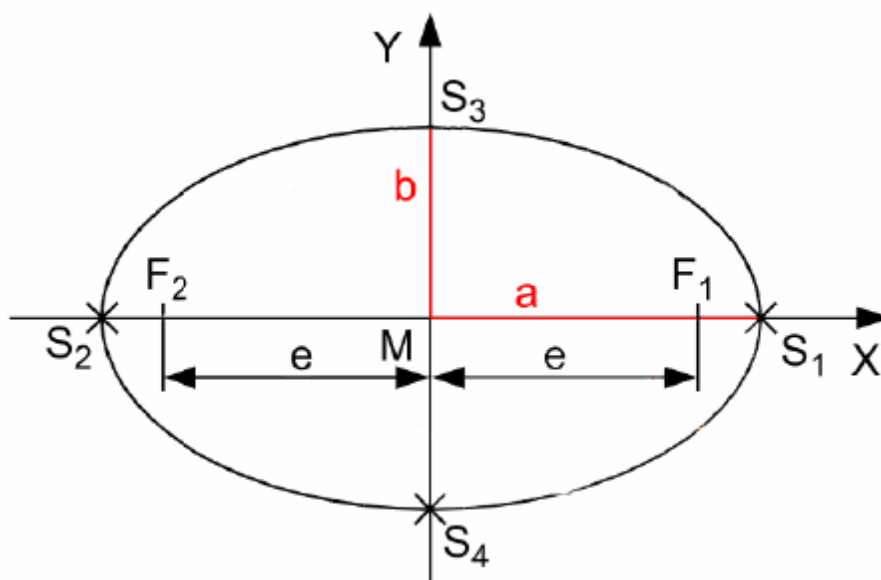
Proces digitalizace obrazu, v našem případě snímání mikroskopických snímků televizní CCD kamerou, bývá obecně doprovázen různými druhy degradací, způsobené vadami čoček, špatným zaostřením, pohybem snímání scény, systematickými nebo náhodnými chybami senzorů atd.. Existují tři hlavní přístupy k problému klasifikace objektů – hrubá síla, normalizace obrazu a hledání invariantních příznaků. V případě použití hrubé síly hledáme prostor všech možných degradací obrazu. To znamená, že učicí sada každé třídy by měla obsahovat nejen vzor každé třídy, ale také jejich potočené, zvětšené, zmenšené a deformované verze. Tento přístup je extrémně časově náročný a v mnoha případech je prakticky nepoužitelný. V normalizačním přístupu jsou objekty transformovány na nějakou standardní pozici předtím, než se předají ke klasifikaci. Přístup s použitím invariantních příznaků se jeví jako nejslibnější. Základní ideou je popis objektů sadou invariantních příznaků, které nejsou citlivé k zvláštním deformacím a které poskytují dostatek popisných informací pro třídění objektů. [10, 13]

2.7 Excentricita

Excentricita může být vyjádřena jako výstřednost. Jedná se o skalární veličinu. Vyjadřuje poměr vzdálenosti mezi ohniskem elipsy a délkou její hlavní osy. Excentricita nabývá hodnot od nuly do jedné. Minimální hodnota, jíž je nula, značí kruh. Maximální hodnota, jíž je 1 je elipsa, která má tvar úsečky.

Excentricita se vypočítá dle vzorce:

$$e = \frac{\varepsilon}{a} = \frac{\sqrt{a^2 - b^2}}{a} \quad (3)$$



Obr. č. 8: Vyznačení excentricity v elipse [14]

Kde značí:

- a - délka hlavní poloosy
- b – délka vedlejší poloosy
- F1, F2 – ohniska
- e - excentricita

3 Praktická část

3.1 Izolace srdečních buněk

Kardiomyocyty byly získávány od cca 250g potkanů enzymatickou disociací. Explantované srdce bylo kanylováno peristaltickým čerpadlem přes aortu při konstantním průtoku 5ml/min roztokem obsahujícím 0,9 mmol/l CaCl_2 . Následně bylo srdce proplachováno roztokem tyrodem bez vápníku, obsahujícím však kolagenázu a proteázu. V dalším kroku bylo srdce odděleno od kanyly a komory rozřezány na malé části. Následně došlo k uložení do tyrodu s kolagenázou a jemnému mixování. Po 30 sekundách bylo médium nahrazeno Tyrodem (0,9 mmol/ CaCl_2) a mixováno znovu po dobu 10 sekund. Supernatant (více než 50% tyčovitých buněk) by na filtrován a vložen do 0,9 mmol/ CaCl_2 .

3.2 Příprava externího roztoku

Pro uchovávání buněk byl vytvořen roztok (Tyrode). V první části došlo ke zkalibrování pH-metru Sentron Titan X pomocí tří základních pufrů. Následovalo navážení stanového množství chemických sloučenin nutných pro přípravu 1 litru roztoku. Titrováním bylo dosaženo pH 7,4.

Tab. č. 2: Seznam chemikálií

NaCl	Chlorid sodný
KCl	Chlorid draselný
MgCl_2	Chlorid hořečnatý
HEPES	Stabilizátor pH
HaH_2PO_4	Dihydrogenfosforečnan sodný
NaOH	Hydroxid sodný
CaCl_2	Chlorid vápenatý
Glukóza	
Pufry	4.00, 7.00, 10.00

Externí fyziologický roztok (tyrode) je roztok, jehož složení je velmi podobné složení roztoku vyplňujícího samotný mezibuněčný prostor a to především co do koncentrace přítomných iontů. Změnou koncentrace iontů v tomto roztoku lze ovlivňovat, jaké ionty budou procházet iontovými kanály v buňce.

Příprava pH- Metru

Pomocí stříčky byla opláchnuta sonda pH-metru destilovanou a poté byla ponořena do nádoby s nasyceným roztokem KCl. Tento postup je nutný k regeneraci referenčního systému a membrány sondy. Po vyjmutí byla sonda opláchnuta destilovanou vodou. Po zapnutí pH-metru byla sonda ponořena do pufru s číslem 7,00 po dobu patnácti minut. Po nastavení kalibrace bylo zvoleno tříbodové měření. Postupně byly nastaveny ještě další 2 pufrы a to pufr s číslem 4,00 a 10,00. Mezi každou výměnou pufrů byla sonda důkladně opláchnuta destilovanou vodou.

Navážení stanoveného množství chemických sloučenin

Do kádinky o objemu 2l a pomocí 1 litrové odměrné baňky byl odměřen jeden litr deionizované vody, který byl do kádinky přelit. Kádinka byla postavena na míchačku, vloženo míchadlo a míchačka zapnuta.

Sloučeniny byly naváženy v následujícím pořadí s přesností na 2 desetinná místa.

Tab. č. 3: Složení externího roztoku (pro 1l)

K-Tyrode	Množství [mM]	Mol. hm. [g/mol]	Množství [g/1l]	Naváženo [g]
NaCl	135	58,44	7,8894	7,8875
KCl	5,4	74,55	0,4026	0,4042
MgCl₂	0,9	203,3	0,1830	0,1818
HEPES	10	238,3	2,3830	2,3875
NaH₂PO₄	0,33	156,01	0,0515	0,0525

Titrování výsledného roztoku

Po kalibrování pH-metru a navážení chemikálií, bylo vyčkáno, až se látky ve vodě rozpustí. Poté byla do kádinky vnořena sonda a vyčkáno, až hodnota pH ustálí. Následně bylo přidáváno po 1ml 3M NaOH až do dosažení pH 7,4. Mezi každým

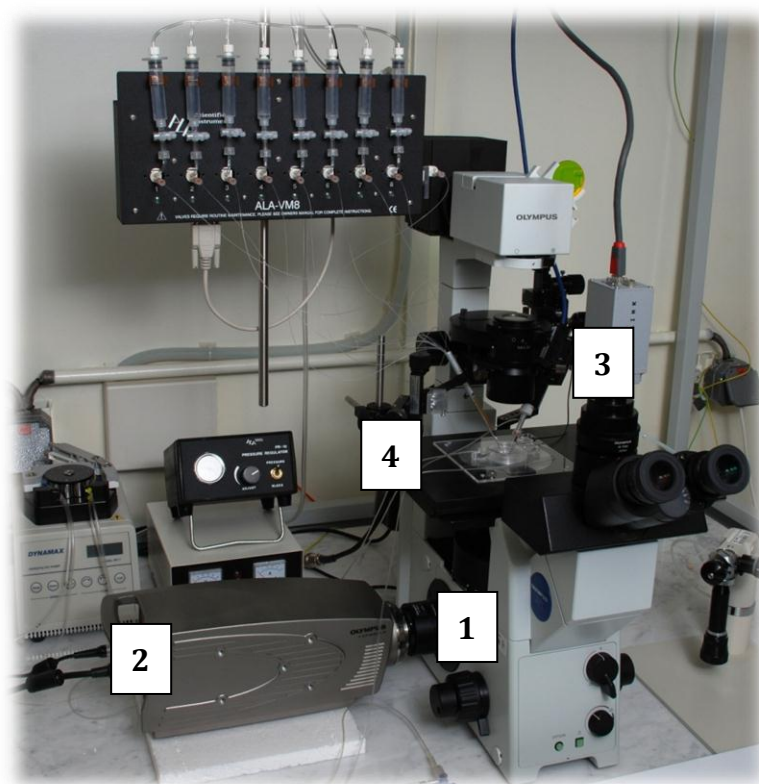
přidáním, bylo vyčkáno na ustálení hodnoty pH. Bylo dbáno na to, aby se nekapalo NaOH na stěnu kádinky či přímo na sondu.

Další látky jako CaCl_2 a glukóza byly do výsledného externího roztoku přidány až před samotným měřením. Pro výpočet objemu roztoku CaCl_2 , z důvodu dosažení koncentrace 0,9mM byl využit následující vzorec. Obdobný postup byl využit i pro glukózu, kde bylo dosahováno koncentrace 2g/l.

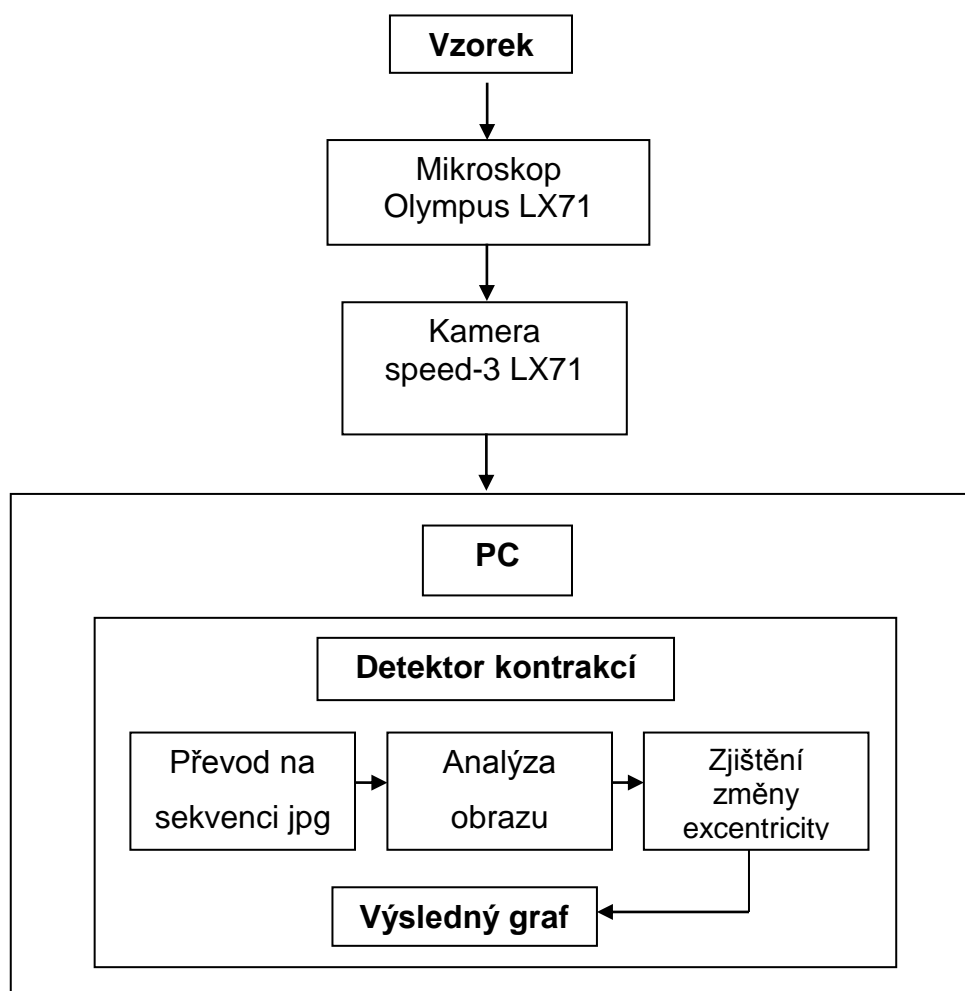
$$c_1 \cdot V_1 = c_2 \cdot V_2 \quad (4)$$

3.3 Kontraktibilita izolovaných srdečních buněk

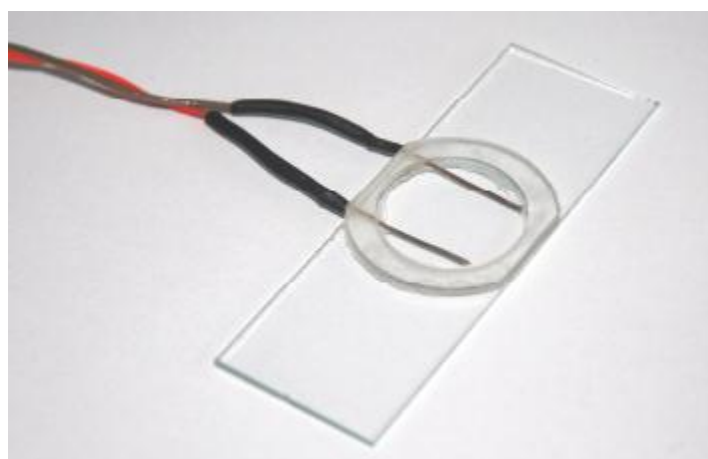
Praktická část se v hlavní míře zabývá zpracování vstupního videa na analytické zobrazení excitace buňky v závislosti na čase. Snímací systém tvoří kamera, počítač, mikroskop, stimulační lázeň a příslušný software.



Obr. č. 9: Vlastní testovací sestava zachycující mikroskop Olympus IX71 (1), kameru Olympus iSpeed-3 (2), kameru PixelINK PL-B742F (3) a buněčnou lázničku (4). Systém je propojen s patch clamp systémem. [15]



Obr. č. 10: Blokové schéma



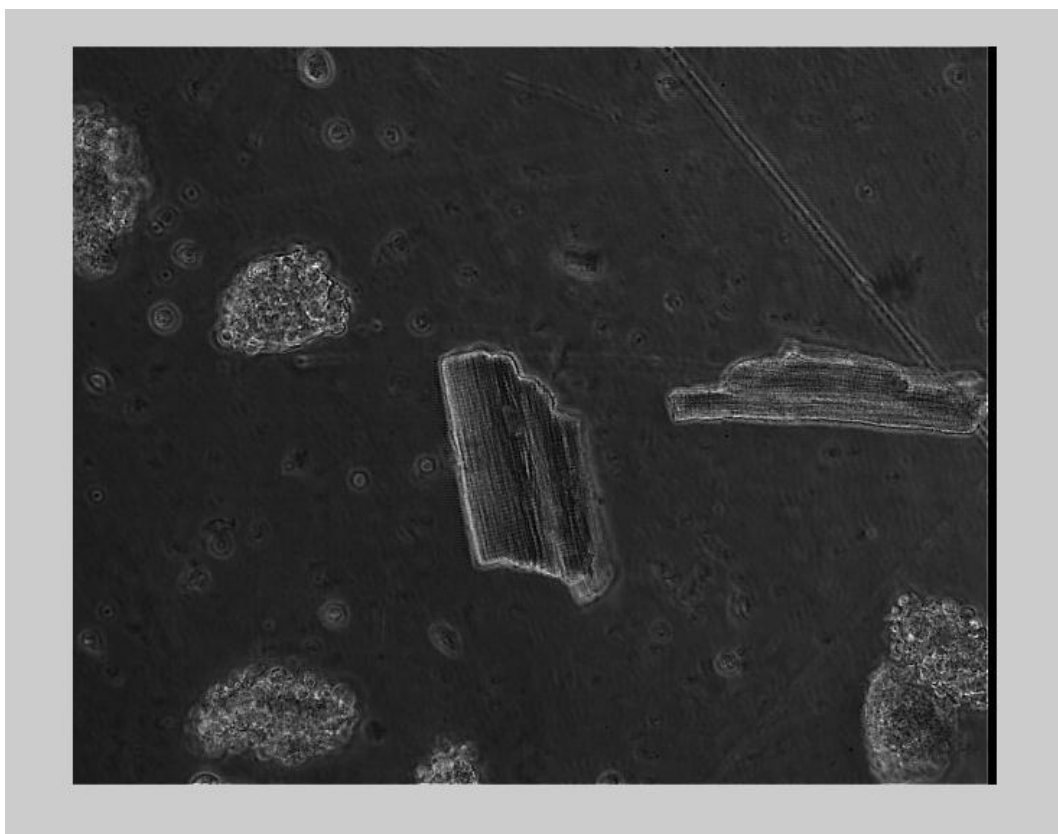
Obr. č. 11: Systém elektrod na podložním sklíčku [3]

Pro stimulaci cardiomyocytu bylo použito impulsů o velikosti 10 mA a délce 20 ms.

3.3.1 Detektor kontrakce srdečních buněk

V první řadě byl převeden formát .hsv s fps 500 a zvětšením 400x, který byl získán z kamery na sekvenci obrazů formátu .jpg. K tomuto účelu byl využit software i-SPEED kontrol Software.

Ve vytvořeném detekčním programu byly vytvořeny dva dotazy, které se spouští ihned po zapnutí. První se týká složky, ve které se nachází sekvence k analýze. Druhý dotaz vyžaduje vzorkovací frekvenci, jelikož ta je potřeba pro určení časové osy výsledného grafu.



Obr. č. 12: Načtený obraz ze sekvence

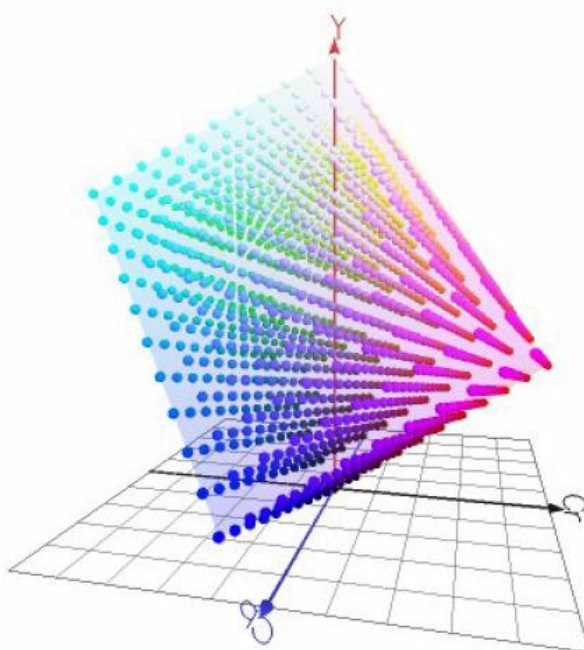
3.3.1.1 Úprava obrazu

Obraz byl převeden z formátu RGB do formátu YcbCbCr, odkud byla následně použita pouze složka Y. Pomocí horní meze vybrána potřebná data a vytvoření základního obrazu.

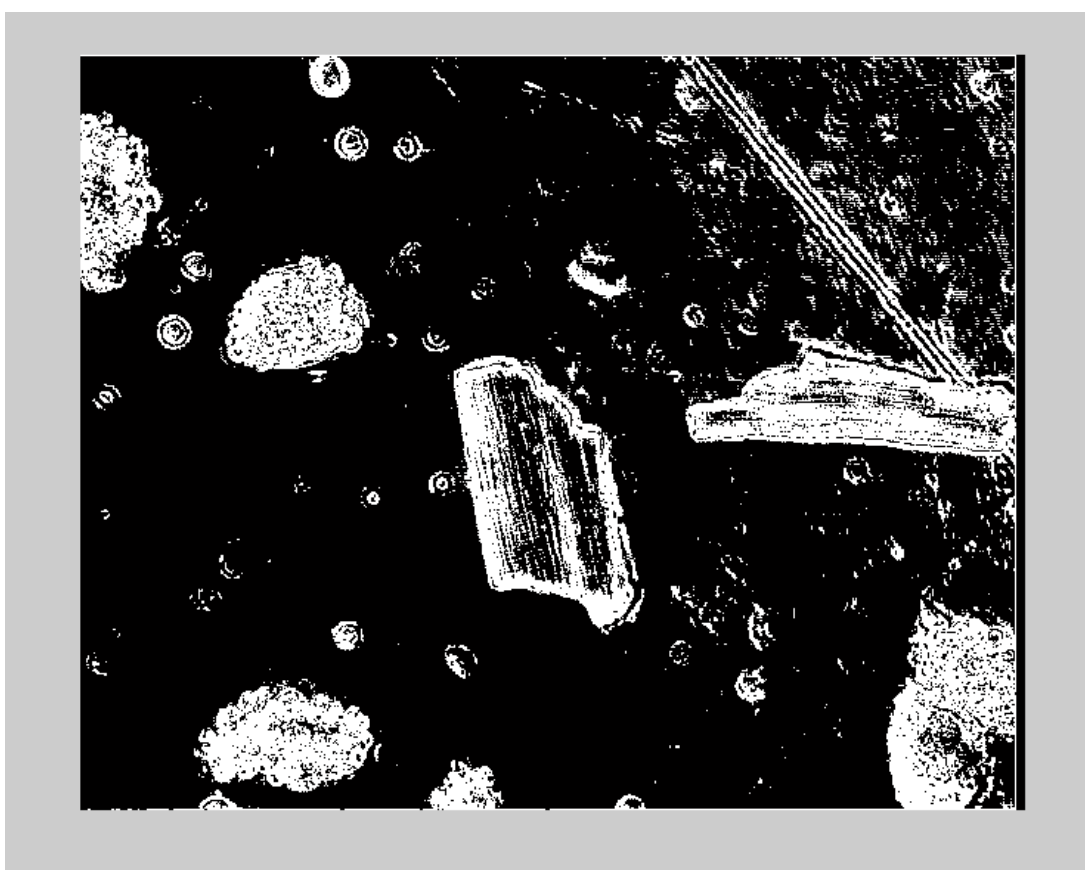
Model YCbCr je používán pro přenos televizních signálů v normě SECAM. V tomto barevném modelu se také zapisují obrázky ve formátu JPEG. Z modelu YCbCr je kdykoliv možné převést daný obraz do barevného modelu RGB nebo CMYK aniž by se kvalita obrazu zhoršila nebo se obraz deformoval. Y představuje jasovou složku, Cb modrou složku a Cr červenou složku. Tento model je oproti barevnému modelu RGB výhodnější pro práci z toho důvodu, že informaci nesou pouze dvě čísla Cb a Cr, nikoliv tři jako to bylo u RGB modelu. [14]

Přepočet z formátu YCbCr do formátu RGB probíhá dle následujícího vzorce:

$$\begin{bmatrix} Y \\ Cb \\ Cr \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 16 \\ 128 \\ 128 \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} 65,481 & 128,553 & 24,966 \\ -37,797 & -74,203 & 112 \\ 112 & -93,786 & -18,214 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} R \\ G \\ B \end{bmatrix} \quad (4)$$

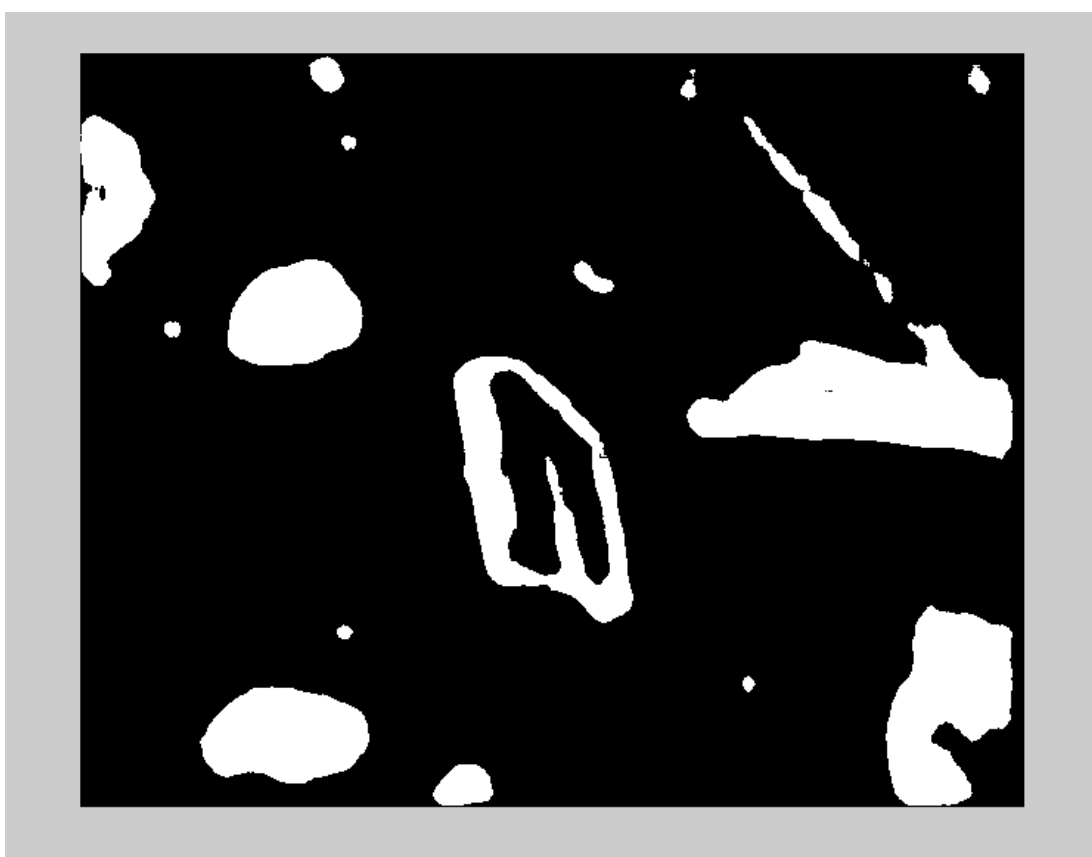


Obr. č. 13: YCbCr barevný model [14]



Obr. č. 14: Základní obraz

Pro odstranění malých částí z obrazu byla využita mediánová filtrace. Výsledek filtrace lze vidět na obrázku č. 15.



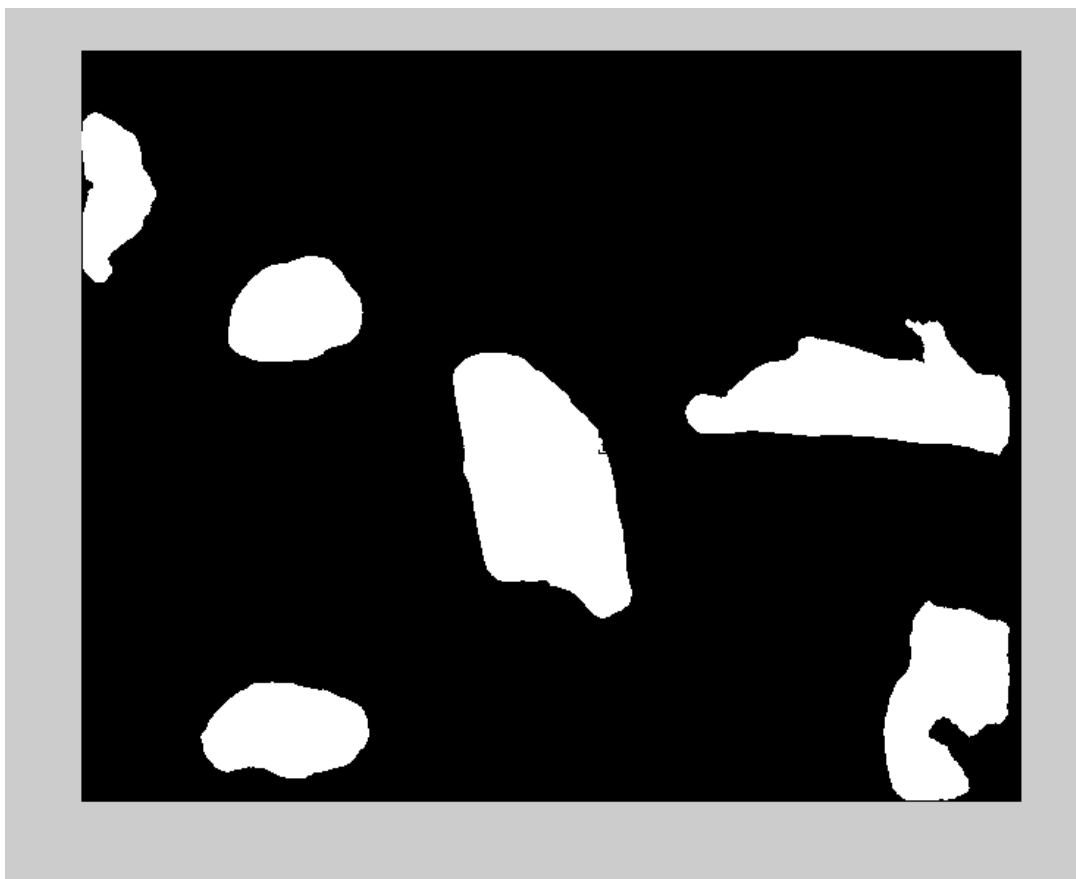
Obr. č. 15: Obráz po mediánové filtraci

Jelikož obraz stále obsahoval malé částice, došlo k jejich identifikování a odstranění. Výsledek lze vidět na obrázku č. 16.



Obr. č. 16: Obráz po odstranění malých částí

V následném kroku došlo k odstranění vnitřních ploch a tím k získání jednotlivých buněk. Výsledek filtrace lze vidět na obrázku č. 17.



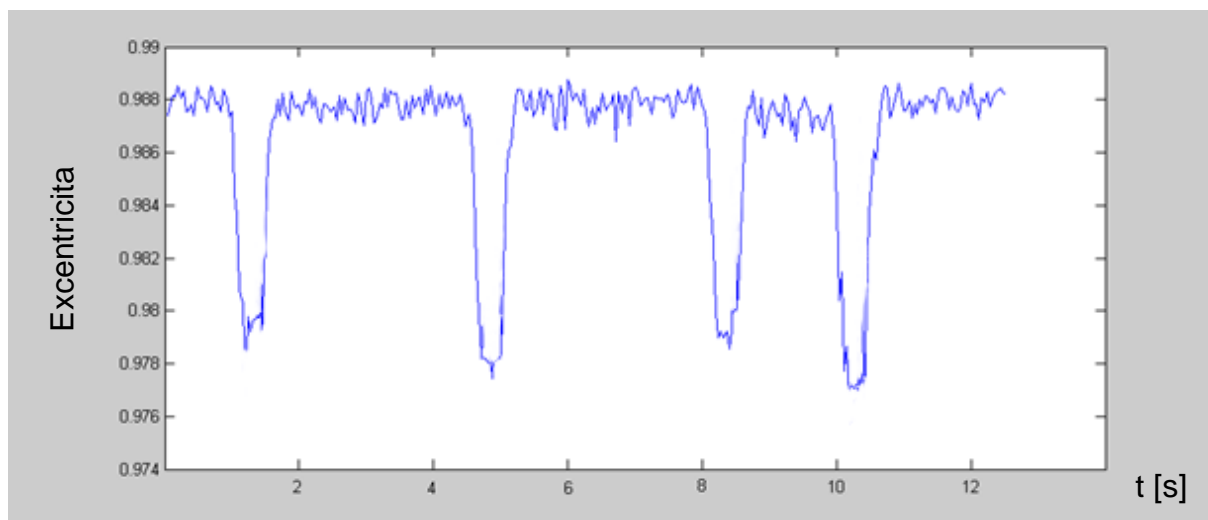
Obr. č. 17: Obrázek po vyplnění ploch

3.3.1.2 Excentricita

Pro sledování kontrakce cardiomyocytu byla zvolena veličina excentricita, pro kterou byl následně vytvořen vzorec pro výpočet a uložení do výsledné matice. Excentricita byla vypočítána pro každý jednotlivý obrázek.

3.3.2 Výsledky kontraktibility

Z postupného ukládání do matice vzniknul graf pro průběžné pohyby (změny excentricity) dané buňky.



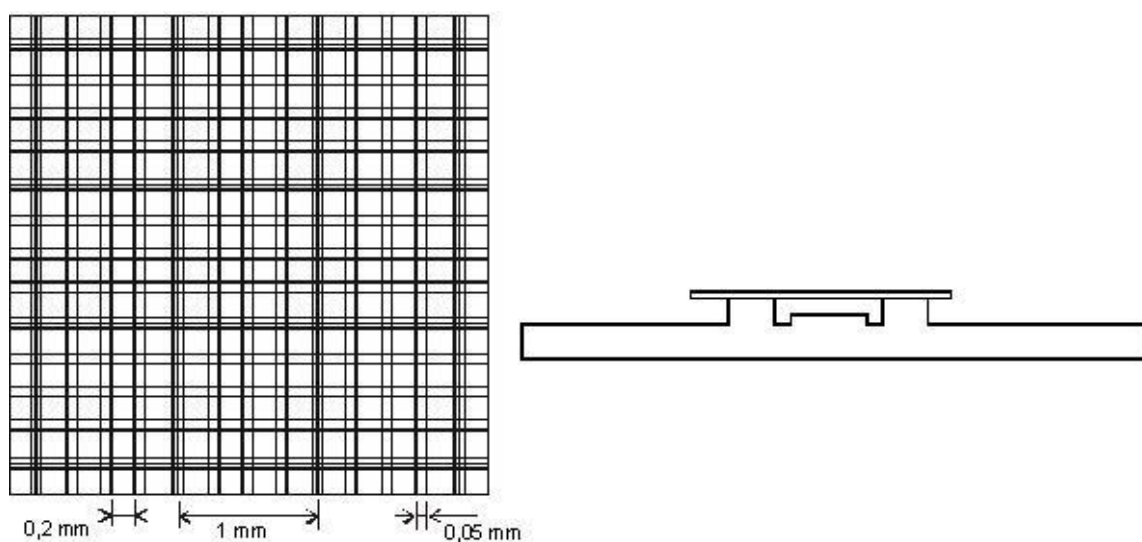
Graf č. 1: Výsledný obraz sledování excitace

Na základě výsledku lze usoudit, že uvedeným způsobem lze detekovat a graficky znázornit kontraktibilitu srdeční buňky. Jelikož systém detekuje jednotlivé buňky samostatně a ukládá je do řádků v matici, lze jednoduše zobrazit také více excentricit z jednoho jediného analyzovaného vzorku. Na základě změny rozsahu excentricity lze také za použití vhodného středního prahu určit počet kontrakcí z nalezení zákmitů pod danou prahovou hodnotu.

3.4 Viabilita buněk

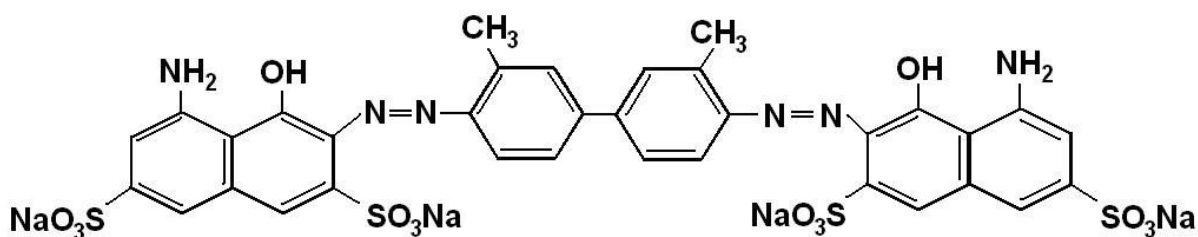
3.4.1 Sčítání buněk v Bürkově komůrce

Pro prvotní sčítání počtu buněk bylo využito Bürkovy komůrky. Komůrka obsahuje mikroskopické sklíčko, na němž jsou vybroušená dvě pole hluboká přesně 0,1 mm. Na dně těchto polí je síťovitý obrazec, který je zobrazen i se vzdálenostmi jednotlivých polí na obrázku číslo 19.



Obr. č. 18: Bürkova komůrka [17]

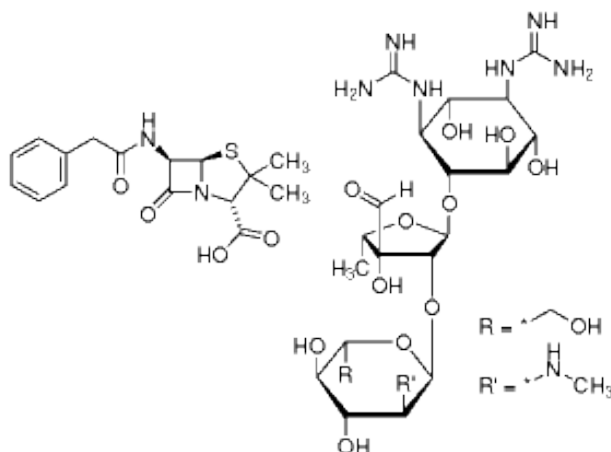
Z důvodu rozlišení živých a mrtvých buněk, bývá často přidáváno barvivo. Většinou se jedná se o barvivo, které neprochází intaktní buněčnou membránou, či je z intracelulárního prostoru aktivně transportováno ven. Na uvedených vzorcích bylo použito roztoku tripanové modři. Při použití tohoto barviva dochází k jevu, kdy buňky, u nichž je porušena integrita buněčné membrány a jejich mechanismů, se rychle zbarví na modro. U živých buněk je barvivo aktivně transportováno přes buněčnou membránu, a tudíž se nebarví. Po smísení buněčné suspenze s roztokem tohoto barviva proto živé buňky zůstávají světlé, zatímco mrtvé se obarví na modro.



Obr. č. 19: Vzorec trypanové modři [17]

Postup při zjišťování počtu živých a mrtvých buněk byl následující:

1. Přidání 2 % P-S k buněčnému roztoku
 - při 10 ml → 200 μ l
2. Vytvoření buněčného roztoku s tripanovou modří v poměru 1:1
 - 0,5 ml tropanové modři + 0,5 ml cardiomyoctů
3. Vložení do ependorfovy nádoby
4. Reakce cca 15 minut
5. Nanesení 50 μ l na každou mřížku Bůrkovy komůrky
6. Spočtení počet buněk v objemu



Obr. č. 20: Vzorec penicilinu-streptomycinu [21]

Při aplikaci na Bůrkovu komůrku probíhalo tak, aby se naplnily obě poloviny. Bylo třeba aplikovat takové množství roztoku, aby se komůrka právě naplnila, ale roztok nesměl přetékat do okolních žlábků.

Následně došlo pod světelným mikroskopem při nejmenším zmenšení k počítání zvlášť živých (bezbarvých) a mrtvých (modrých) buněk. Výpočet probíhal

tak, že se nejprve spočetlo 5 čtverců (4 rohové a středový) 1 × 1 mm v jedné polovině komůrky. byl-li celkový počet buněk menší než 100, počítali se buňky i v dalších 5 čtvercích ve druhé polovině komůrky. Za hranici čtverce byla považována prostřední linka z trojitě čáry. Z buněk, ležících na okraji čtverce, byly počítány ty, které se i jen dotýkají levého nebo horního okraje, a naopak nebyly počítány ty, které se i jen dotýkají pravého nebo dolního okraje.

Tab. č. 3: Sčítání živých a mrtvých buněk

Okno	Živé	Mrtvé	
1.	9	15	
2.	5	10	
3.	11	9	
4.	6	13	
5.	5	16	
Suma	36	63	99

Počet výsledných buněk byl spočítán dle vzorce:

$$P = \frac{N \cdot D \cdot 1000}{H \cdot S} = \frac{99 \cdot 1 \cdot 1000}{0,1 \cdot 5} = \underline{\underline{198\,000 \text{ [buněk]}}}$$

Kde:

P - počet buněk v 1 ml suspenze

N - celkový počet buněk

D - ředění suspenze

H - hloubka komůrky v mm

S - počet čtverců

Výpočet viability izolovaných srdečních buněk byl dle vzorce:

$$X = \frac{\check{Z}}{C} = \frac{36}{99} = 0,3636 = \underline{\underline{36,36 \%}}$$

Kde:

X - poměr živých buněk

Ž - živě buňky

C - celkový počet buněk

3.4.2 Kultivace buněk

Kultivace buněk probíhala ve dvou samostatných médiích. Jednalo se o DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) a RPMI (Roswell Par Memorial Institute Medium). Dále také těchto dvou uvedených médiích s přidáním FBS (Fetal bovine serum).

DMEM byl vynalezen v roce 1969 jako modifikace BME (Basal Medium Eagle) a obsahuje čtyřikrát vyšší koncentraci aminokyselin a vitamínů. RPMI je dalším typem kultivačního média, obsahující velké množství fosfátů. FBS značí část plasmy zbývající po koagulaci krve, probíhající při přechodu proteinu fibrinogenu na fibrin a vzniku sraženiny.

Příprava 4 médií pro kultivaci probíhala následujícím způsobem:

1. RPMI

20 ml RPMI

2 % P-S → 400 µl P-S

2. RPMI + FBS

20 ml RPMI

2 % P-S → 400 µl P-S

10 % FBS → 2 ml FBS

3. DMEM

20 ml DMEM

2 % P-S → 400 µl P-S

4. DMEM + FBS

20 ml DMEM

2 % P-S → 400 µl P-S

10 % FBS → 2 ml FBS

Poznámka: P-S značí penicilin-streptomycin

V následujícím kroku bylo do každé jamky plata 50 µl média a 50 µl cariomyocytů. Dávkování probíhalo ve čtyřech řádcích a vzniklo tedy pro každý druh dvanáct vzorků. Následně bylo plato vloženo do inkubátoru.

Po určitém pravidelném čase bylo plato vyndáno z inkubátoru a přidáno 20 µl do každé jamky jednoho sloupce. Po patnáctiminutové reakci byl počítán počet živých a mrtvých buněk. Sčítání probíhalo se zvětšením mikroskopu 40 x na pěti místech.

3.4.3 Výsledky viability

Výsledky sčítání buněk v Bürkově komůrce dosahovali hodnot viability pod padesát procent. Výsledky sčítání lze vyčíst v tabulce číslo 4.

Tab. č. 4: Sčítání živých a mrtvých buněk v Bürkově komůrce

Datum	16.12.		15:00	
Mřížka	A		B	
Viabilita	Ž	M	Ž	M
1.	11	10	6	7
2.	5	6	1	6
3.	9	8	2	7
4.	6	4	4	2
5.	5	9	1	1
Suma	36	37	14	23
	Ž: 50	M: 60		
	Celkem: 110			
	Viabilita: 45%			

Sčítání kultivovaných buněk probíhalo v intervalu 12 hodin a častěji. Z naměřených výsledků lze usoudit, že nejlepší médium pro kultivaci je DMEM. Kombinace DMEM s FBS příliš výsledek neovlivnila. Výsledky jsou znázorněny v grafu č. 2.

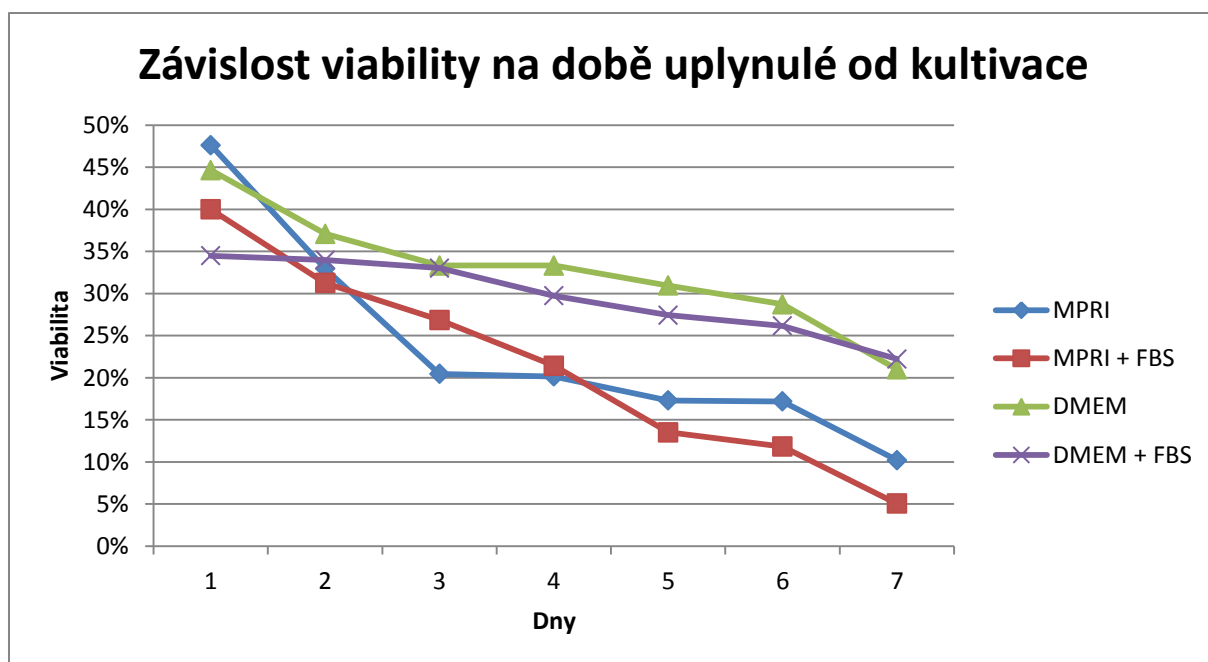
Tab. č. 5: Tabulky zjištěných viabilit vzorků

Datum a čas:	17.12.2010					15:00					18.12.2010					15:00				
Měření	1		2		3		4		5		1		2		3		4		5	
Viabilita	Ž	M	Ž	M	Ž	M	Ž	M	Ž	M	Ž	M	Ž	M	Ž	M	Ž	M	Ž	M
MPRI	6	7	7	5	4	11	8	3	5	7	5	8	10	8	5	19	5	18	5	8
MPRI + FBS	13	26	6	25	5	8	4	21	8	18	5	27	7	11	5	30	5	33	8	9
DMEM	7	8	12	8	14	22	7	12	6	7	5	12	4	14	7	14	8	16	3	11
DMEM + FBS	6	13	7	13	10	13	6	19	7	15	7	33	15	29	9	17	6	27	8	13
Suma:	32	54	32	51	33	54	25	55	26	47	22	80	36	62	26	80	24	94	24	41
	Ž:		148		M:		261		Ž:		132		M:		357					
	Suma:		409		Viabilita:		36%		Suma:		489		Viabilita:		27%					

Datum a čas:	19.12.2010					15:00					20.12.2010					15:00				
Měření	1		2		3		4		5		1		2		3		4		5	
Viabilita	Ž	M	Ž	M	Ž	M	Ž	M	Ž	M	Ž	M	Ž	M	Ž	M	Ž	M	Ž	M
MPRI	7	25	7	51	4	18	3	12	2	4	6	12	14	55	7	50	5	7	4	16
MPRI + FBS	5	7	5	10	3	3	4	16	3	8	13	13	4	10	6	10	6	10	3	5
DMEM	5	12	3	7	8	14	5	15	5	10	13	21	4	20	7	4	4	7	2	8
DMEM + FBS	3	8	8	31	18	13	4	9	3	9	10	25	12	39	12	36	4	9	6	45
Suma:	20	52	23	99	33	48	16	52	13	31	42	71	34	124	32	100	19	33	15	74
	Ž:		105		M:		282		142		402									
	Suma:		387		Viabilita:		27%		544		26%									

Datum a čas:	21.12.2010					15:00					22.12.2010					15:00				
Měření	1		2		3		4		5		1		2		3		4		5	
Viabilita	Ž	M	Ž	M	Ž	M	Ž	M	Ž	M	Ž	M	Ž	M	Ž	M	Ž	M	Ž	M
MPRI	1	11	1	4	4	32	3	1	2	5	4	5	2	3	16	96	3	0	3	7
MPRI + FBS	1	9	0	7	0	35	2	24	2	19	8	79	8	28	5	78	0	0	5	9
DMEM	1	8	10	9	23	60	5	5	5	6	2	5	3	1	9	11	7	11	2	11
DMEM + FBS	0	4	3	7	9	27	2	4	3	6	2	5	1	9	12	26	3	0	4	12
Suma:	3	32	14	27	36	154	12	34	12	36	16	94	14	41	42	211	13	11	14	39
	Ž:		77		M:		283		Ž:		99		M:		396					
	Suma:		360		Viabilita:		21%		Suma:		495		Viabilita:		20%					

Datum a čas:	23.12.2010					15:00				
Měření	1		2		3		4		5	
Viabilita	Ž	M	Ž	M	Ž	M	Ž	M	Ž	M
MPRI	8	71	3	40	3	10	1	1	0	10
MPRI + FBS	4	13	1	3	1	21	1	1	3	26
DMEM	4	19	5	4	6	38	1	8	5	10
DMEM + FBS	3	4	3	15	5	6	0	0	9	13
Suma:	19	107	12	62	15	75	3	10	17	59
	Ž:		66		M:		313			
	Suma:		379		Viabilita:		17%			



Graf č. 2: Závislost viability na době uplynulé od kultivace

4 Závěr

Uvedená práce se zabývá měřením kontraktibility a viability izolovaných srdečních buněk.

V teoretické části došlo ke zpracování informací týkajících se elektrofyzologie srdečních buněk, regenerace buněk a zpracování obrazu.

Praktická část se první řadě zabývá zjištěním kontraktibility izolované srdeční buňky. Pro detekci změny pohybu buňky byla zvolena excentricita. Zaznamenávání změny excentricity v závislosti na kontrakci bylo vytvořeno v programu Matlab. Systém umožňuje zároveň zjištění, zdali je buňka živá či mrtvá. Excentricita kulaté (mrtvé) buňky se blíží nule, zatímco obdélná (živá) buňka má excentricitu blíží rovnu přibližně jedna. Zhodnocení kontraktibility v závislosti na době uběhlé od kultivace ovšem bohužel nebylo realizováno. V době, kdy byl vytvořený detektor a připravené veškeré postupy k měření, nebyly na lékařské fakultě několik měsíců izolovány žádné srdeční buňky.

Praktická část pokračuje zjištěním změny viability v jednotlivých médiích v závislosti na době uplynulé od kultivace. Pro lepší rozlišení živé a mrtvé buňky, bylo využito barviva tropanové modři. Počáteční viability buněk se pohybovala těsně pod padesáti procenty, přičemž za 7 dní klesla u MPRI přibližně na 25 % a u DMEM na 8 %. Z uvedených kultivačních médií (DMEM, DMEM+FBS, RPMI, RPMI+FBS) bylo zjištěno, že nejlepší prostředí pro kultivaci je DMEM.

Použitá literatura

1. Vejražka M.: *Buněčné kultury*, [online]. 2011 [cit. 2011-04-25]. Dostupný z WWW:<<http://bioprojekty.lf1.cuni.cz/3381/sylaby-prednasek/textova-verze-prednasek/bunecne-kultury-vejrazka.pdf>>
2. Vávra J., Radvanský J.: *Fysiologie a patofysiologie kardiovaskulárního systému*, [online]. 2011 [cit. 2011-04-25]. Dostupný z WWW: < <http://ktl.lf2.cuni.cz/text/fysiologie/kardiovaskular.pdf>>
3. Čmiel, V, Provazník, I; *Systém pro snímání a vyhodnocení kontrakce izolované srdeční buňky v prostředí LabView*; Elektrevue 2009/40-4.8.2009, ISSN 1213-1539
4. Šimurda, J., *Bioelektrické jevy*. 2007, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, VUT Brno. p. 1 - 72.
5. Vyskočil, F., *Regenerace srdečních buněk*. Vesmír, 2005. 84.
6. Wang, G.-X., et al., *Effects of doxorubicinol on excitation-contraction coupling in guinea pig ventricular myocytes*. European Journal of Pharmacology, 2001. 423(2-3): p. 99-107.
7. Diaz, R.J. and G.J. Wilson, *Studying ischemic preconditioning in isolated cardiomyocyte models*. Cardiovascular Research, 2006. 70(2): p. 286-296.
8. Kammermeier, H. and H. Rose, *Are isolated cardiomyocytes a suitable experimental model in all lines of investigation in basic cardiology?* Basic Research in Cardiology, 1988. 83(4): p. 343-349.
9. Skopalík, J., et al., *Measurement of viability of adult cardiomyocytes under specific culture conditions*. Časopis lékařů českých. 148(12): p. 637-638.
10. Štráfelda, P., *Detekce objektů*, in *Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií*. 2006, VUT Brno.
11. Korotvička, A., *Detekce objektu*, in *Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií*. 2004, VUT Brno: Brno.
12. Šonka, M. and V. Hlaváč, *Počítačové vidění*. 1992, Praha.
13. Flusser, J., *Invariantní funkcionály a jejich použití v počítačovém zpracování obrazu*. 2004, České vysoké učení technické: Praha. p. 37.
14. Pléha, D., *Rozpoznávání obličeje*, in *Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií*. 2008, VUT Brno: Brno. p. 45.

15. Čmiel, V., Rychtárik, M., Provazík, I.: *Detektor kontrakcí izolovaných srdečních buněk*. 2009, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií.
16. Vejražka, M.: *Základní techniky práce s tkáňovými kulturami*. [online]. 2011 [cit. 2011-04-25]. Dostupný z WWW: < <http://che1.lf1.cuni.cz/html/TK.pdf>>
17. Štípek, S.: *Základní techniky práce s tkáňovými kulturami* [online]. [cit. 2011-05-10]. Dostupný z WWW:< <http://che1.lf1.cuni.cz/html/TK.pdf>>.
18. Translational bioscience 2003 - 2008 [online]. [cit. 2011-05-10]. Dostupný z WWW:<http://www.tcd.ie/IMM/translational_bioscience_2003_2008/img/spiers3.jpg>.
19. KVAPIL, R. – Kardiomyopatie a genetika [online]. 2008 [cit. 2009-03-10]. Dostupný z WWW: <<http://www.vetweb.cz/projekt/clanek.asp?pid=2&cid=5665/>>.
20. Burstein, B., Nattel, S. Atrial Fibrosis: Mechanisms and Clinical Relevance in Atrial Fibrillation [online]. 2008 [cit. 2009-03-10]. Dostupný z WWW: <<http://content.onlinejacc.org/cgi/contentnw/full/51/8/802/>>.
21. Penicilin-Streptomycin [online]. [cit. 2011-05-10]. Dostupný z WWW:<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?D7=0&N5=SEARCH_CONCAT_PNO|BRAND_KEY&N4=P4333|SIGMA&N25=0&QS=ON&F=SPEC>.
22. Šonka, M., Hlaváč, V., *Počítačové vidění*, Praha, 1992, ISBN 80-85424-67-3
23. Basic Cell Culture: A Practical Approach. J.M.Davis (ed.) 2nd Ed., Oxford University Press, Oxford. 2002. ISBN 0 19 963853 5
24. Animal Cell Culture: A Practical Approach. R.I.Freshney (ed.), 2nd Ed., Oxford University Press. Oxford, 1992. ISBN 0 19 963213 8
25. Bébarová M, Matejovič P, Pásek M, Šimurdová M, Šimurda J. *Effect of Ajmaline on Action Potential and Ionic Currents in Rat Ventricular Myocytes*. Gen Physiol Biophys 2005; 24: 311–325.
26. Beeres S, Atsma ED, der Laarse A. *Human Adult Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Repair Experimental Conduction Block in Rat Cardiomyocyte Cultures*. Journal of the American College of Cardiology 2005; 46: 1943–1952.
27. London B, Krueger J. W.: Contraction in voltage-clamped, internally perfused single heart cells, J. Gen. Phys., 1986, vol. 88
28. Xu W.H., et al.: Measurement of Contraction of Isolated Cardiomyocytes During Anoxia/Reoxygenation and the Antagonism of Salvia Miltiorrhiza, 2001

Přílohy

Příloha č. 1: Zdrojový kód detektoru

```
clc;
close all
clear all

%načtení obrazu
imagepath = uigetdir('', 'Vyhledejte požadovanou složku');
patternname = '*.jpg';
imagelist = dir(fullfile(imagepath,patternname));
imdata = cell(1,numel(imagelist));

%Nastavení vzorkovací frekvence
FVZ = input('Vložte hodnotu vzorkovací frekvence: ');

for k=1:numel(imagelist)
    imdata{k} = imread(fullfile(imagepath,imagelist(k).name));

    %Převedení z RGB do YcbCbCr
    cbc_r_obr = rgb2ycbcr(imdata{k});
    %imshow (imdata{k})
    %imshow (cbc_r_obr);

    %Získání Y složky
    Y = cbc_r_obr(:,:,1);

    %Porovnání a vykreslení potřebných bodů
    referent = ((Y>0) & (Y<140));
    %imshow (referent);

    %Mediánová filtrace
    referent_f = medfilt2(referent, [15 15]);
    %imshow(referent_f)

    %-----

    %Eccentricity
    bw = referent_f;
    L_ecen = bwlabel(bw);
    e = regionprops(L_ecen, 'Eccentricity');
    eccentricity = cat(1, e.Eccentricity);
    delet=L_ecen;
    [m o]=size(delet);
    elips = eccentricity;
    [d e]= size(elips);

    %Porovnání eccentriciy
    for i=1:d
        if (eccentricity(i)>0.745) & (eccentricity(i)<1)
            elips(i)=1;
        else
            elips(i)=0;
        end
    end
end
```

```

%Přepsání polí na 1
for i=1:m
    for j=1:o
        if (delet(i,j) ~= 0) & (elips (delet(i,j)) == 1)
            delet(i,j) = 1;
        else
            delet (i,j) = 0;
        end
    end
end

%Odstranění malých částic v obraze
[L_area1, n] = bwlabel(delet);
stats = regionprops(L_area1, 'Area');
allArea = [stats.Area];
idx1 = find([stats.Area] > 1500);
BW2 = ismember(L_area1,idx1);
%imshow (BW2)

%-----
%invert
[w h]=size(BW2);

for i=1:w
    for j=1:h
        if BW2(i,j)==1;
            point(i,j)=0;
        else
            point(i,j)=1;
        end
    end
end

%Invertovaný obraz zbavíme černých ploch
[L_area2, n] = bwlabel(point);
stats = regionprops(L_area2, 'Area');
allArea = [stats.Area];
vybr_bun = find([stats.Area] > 10000);
BW3 = ismember(L_area2,vybr_bun);

%Zpětná inverze
[w h]=size(BW3);

for i=1:w
    for j=1:h
        if BW3(i,j)==1;
            point2(i,j)=0;
        else
            point2(i,j)=1;
        end
    end
end
%imshow(point2)

%Eccentricity
[L_area3, n] = bwlabel(point2);
L_ecen = bwlabel(point2);
e = regionprops(L_ecen, 'Eccentricity');
ec = cat(1, e.Eccentricity);
%imshow (L_area3)

```

```

        %Uložení do výsledné matice
        for s=1:n
            vys_mat(s,k)= ec (s,1);

        end
    end

    %Přepočet vzorkovací frekvence
    for v=1:k
        vz(v)=v/FVZ;
    end

    %Vykreslení výsledné matice
    for w=1:n
        plot(vz(w,1:k),vys_mat(w,1:k))
        hold on
    end
end

```